

Zur Verteilung des Geschlechtschromatins

bei Haarwurzelzellen,

Mundschleimhaut und Leukozyten

Eine vergleichende Untersuchung

Loredana Steiger-Lepore

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Anthropologie und
Humangenetik

ZUR VERTEILUNG DES GESCHLECHTSCHROMATINS BEI HAARWUR-
ZELZELLEN, MUNDSCHLEIMHAUT UND LEUKOZYTEN.

EINE VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität

vorgelegt von

Loredana Steiger-Lepore

München 1974

Referent : Professor Dr. Dr. G. Ziegelmayer

Koreferent.: Professor Dr. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung :



VORWORT

Herr Prof. Dr. Dr. G. Ziegelmayer hat sich als Referent für meine Dissertation einverstanden erklärt; ich möchte ihm hierfür nochmals danken. Dank gebührt auch seinem Assistenten, Herrn Dr. A. Rodewald-Rudescu, der mir wertvolle Hinweise gab und Herrn Dr. W. Fthenakis, der, ohne es zu wissen, mein Interesse für Biostatistik weckte und mich ihre Notwendigkeit besonders für diese Arbeit erkennen ließ.

Schließlich bedanke ich mich noch bei meinen Testpersonen, die sich freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die Entdeckung des Geschlechtschromatins	1
1.2. Morphologische Eigenschaften des Geschlechtschromatins	3
1.2.1. Morphologie des Geschlechtschromatins	3
1.2.2. Position des Geschlechtschromatins im Nucleus	5
1.2.3. Erscheinungshäufigkeit des Geschlechtschromatins	6
1.3. Entstehung des Geschlechtschromatins	9
1.4. Korrelation zwischen der Geschlechtschromatin- und der X-Chromosomenzahl	14
1.5. Geschlechtsdimorphismus in den Leukozyten	15
1.6. Heterochromatin und Geninaktivierung	19
2. Problemstellung und Arbeitshypothese	24
2.1. Arbeitshypothese und ihre Begründung	24
2.2. Praktische Bedeutung des Geschlechtschromatins	28
3. Material und Methoden	30
3.1. Technische Ausführung der Abstriche	30
3.2. Statistische Auswahlkriterien der Testpersonen	34
4. Diskussion	36
4.1. Auswertungskontrolle	36

4.2. Vorläufige Untersuchungsergebnisse und Vergleich mit einschlägigen Ar- beiten	42
4.2.1. Schluß von den Stichprobenan- teilswerten auf die Gesamtheit	42
4.2.2. Vergleich mit einschlägigen Ar- beiten	49
4.3. Überprüfung der Arbeitshypothese	54
4.3.1. Korrelation der Anteilswerte an Chromatin-positiven Nuclei zwi- schen den untersuchten Geweben	54
4.3.2. Voraussetzungen zur Korrelation	61
5. Zusammenfassung	66
Anhang	71
Literatur	80
Lebenslauf	88

1. Einleitung

1.1. Die Entdeckung des Geschlechtschromatins

Die Existenz des Geschlechtschromatins in Nervenzellen, damals Nucleolarsatellit genannt, war den Wissenschaftlern zu Beginn des 20. Jahrhunderts schon bekannt.

Im Jahre 1909 beschrieb der Anatom CAJAL eine paranucleolare Chromatinmasse in Nervengewebe von Katzen, Hunden und Menschen. Im strengen Sinn entdeckten also BARR und BERTRAM nicht das X-Chromatin an sich, sondern seine Beziehung zur Geschlechtsbestimmung.

Schon seit 1939 interessierte sich BARR für die strukturellen Veränderungen, die nach längerer und intensiver Stimulierung in den Synapsen eintreten. Nach dem Krieg setzte er seine Forschungen über periphere Nerven fort. Im Jahre 1947 fand er einen treuen Mitarbeiter in BERTRAM, einem Doktoranden in Anatomie bei der Western Ontario Universität. Sie arbeiteten zusammen an der Entwicklung einer geeigneten Technik für die Stimulierung des Hypoglossus und erforschten die Veränderungen in den Nervenzellen nach längerer Aktivität. Gerade bei diesen Forschungen fiel es BERTRAM auf, daß der Nucleolarsatellit nur bei Zellkernen von weiblichen Katzen vorkam. Nervenzellen von verschiedenen Regionen wurden untersucht, immer mit dem gleichen Ergebnis. Damit wurden zahlreiche Beweise gesammelt, die für die Existenz eines sexuellen Dimorphismus bei Nervenzellen von Katzen sprachen. In einem von der Zeitschrift NATURE publizierten Aufsatz (1949) berichteten BARR und BERTRAM von ihrer Entdeckung. Solcher

Dimorphismus wurde auch bei den Menschen nachgeprüft (OHNO u. MAKINO, 1961a).

Die Bezeichnung "Nucleolarsatellit", die insofern berechtigt war, weil die geschlechtsspezifische Chromatinmasse bei Nervengeweben immer in unmittelbarer Nähe vom Nucleolus erschien, erwies sich mit der Zeit als ungeeignet.

In den meisten übrigen Geweben wurde nämlich der Nucleolarsatellit an der Kernmembrane haftend gefunden (OHNO u. MAKINO, 1961a). Heutige dafür gebrauchte Bezeichnungen sind Geschlechts- bzw. Sexchromatin oder X-Chromatin. Die letztere informiert über den X-chromosomalen Ursprung dieses Gebildes⁺).

⁺) Wie später ausführlicher dargestellt wird, bildet sich das Geschlechtschromatin aus dem heteropyknotischen X-Chromosom in weiblichen Interphasennuclei.

1.2. Morphologische Eigenschaften des Geschlechtschromatins

1.2.1. Morphologie des Geschlechtschromatins

Das X-Chromatin wurde von vielen Wissenschaftlern in vivo beobachtet, und SCHWARZACHER war einer der ersten, der von ihm eine detaillierte Beschreibung gab. Er fand eine kleine dichte Formation in Nuclei von lebendigen weiblichen Fibroblastenzellen bei Beobachtungen in vitro mit einem Phasenkontrastmikroskop. Solches Gebilde war aber in männlichen Zellen der gleichen Gewebe nicht zu finden. Die obengenannten weiblichen Zellen wurden nach vorheriger Fixierung und Färbung überprüft: die Chromatinmasse war immer noch zu sehen, sie war Feulgen-positiv, hatte schärfere Konturen und zeigte weiterhin die gleichen Eigenschaften als in vivo. Man konnte also ruhig die Möglichkeit ausschließen, daß die Erscheinung des X-Chromatins auf die Wirkung der Fixierung und der Färbung zurückzuführen sei.

Die Grundform des X-Chromatins kann man als die eines kurzen doppelten Stabes bezeichnen, sie kann jedoch auch rund, viereckig, oval außenkonkav, bikonkav oder innenkonkav sein. Bei normalen Frauen ist sie am häufigsten oval (DOLLMANN et al., 1972).

Das Geschlechtschromatin zeigt Affinität mit basischen Farbstoffen wie Kresylviolett, Thionin, Karbolfuchsin, Feulgen, Hämatoxylin-Eosin und Orcein.

Seine Größe ist bemerkenswert konstant, es mißt $0,8 \times 1,1 \mu$ mit einem Spielraum von $0,7 \times 1,0$ bis $1,0 \times 1,4 \mu^{+}$ -

die Untersuchung beschränkt sich auf Säugetiere (MOORE u. BARR, 1955; PRINCE, GRAHAM, BARR, 1955; GRAHAM u. BARR, 1959)-. Zytophotometrische Bestimmungen zeigen, daß der DNS-Inhalt in dem X-Chromatin in diploiden, zu verschiedenen menschlichen Geweben gehörenden Nuclei quantitativ unverändert bleibt (KLINGER u. SCHWARZACHER, 1960).

Das gleiche Ergebnis bekommt man bei vergleichenden Bestimmungen des DNS-Inhalts des Sexchromatins unter einigen Primatenfamilien: was gut mit dem Ergebnis übereinstimmt, daß die X-Chromosomgröße mit einigen Ausnahmen ziemlich konstant bei vielen verschiedenen Säugetieren ist⁺) (HAMERTON, KLINGER, MUTTON u. LANG, 1963; CHNO, BEČAK u. BEČAK, 1964).

⁺) Unter der Annahme, die später ausführlicher dargestellt wird, daß das Geschlechtschromatin aus dem heteropyknotischen X-Chromosom in weiblichen Interphasennuclei entsteht.

1.2.2. Position des Geschlechtschromatins im Nucleus

In den nervlichen Zellkernen von Katzen wurde das X-Chromatin am Nucleolus anliegend gesehen (BARR u. BERTRAM, 1949). Solche Lage erwies sich später als Ausnahme, weil normalerweise das X-Chromatin unmittelbar an der Kernmembrane liegt.

In einigen Geweben kann sich die Position des Geschlechtschromatins in verschiedenen zellulären Entwicklungs- oder Funktionsstufen ändern (BARR u. BERTRAM, 1949; GRAHAM, 1954; LINDSAY u. BARR, 1955). Solche Positionsänderungen sind sichtbar in lebendigen Zellen, aber es ist schwierig zu bestimmen, ob diese Bewegungen rein passiv, von anderen inneren zellulären Strömungen hervorgerufen werden.

1.2.3. Erscheinungshäufigkeit des Geschlechtschromatins

Es ist leicht festzustellen, daß technische Faktoren, wie unterschiedliche Fixierungs- und Färbungsmethoden, in hohem Maß auf die Anzahl von erkennbaren Chromatin-positiven Zellkernen einwirken können. Bei verschiedenen menschlichen Geweben und unter Einfluß verschiedener technischer Faktoren beträgt der Prozentsatz Chromatin-positiver Zellkerne durchschnittlich 20-96% (MOORE u. Mitarbeiter, 1953; MOORE u. BARR, 1954; KLINGER, 1957; KLINGER u. SCHWARZACHER, 1960). Hautpartien und Abstriche der Mundschleimhaut weisen eine niedrigere Häufigkeit auf. Bei ihnen finden sich 20-70% Chromatin-positive Zellkerne. Divergierende Häufigkeiten von Chromatin-haltigen Zellen sind bei verschiedenen Geweben und bei gleichartigen Geweben während unterschiedlichen Entwicklungsstufen gefunden worden. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß alle Gewebe Chromatin-negative Nuclei besitzen, wie auch die Feststellung, daß unterschiedliche physiologische Faktoren oder einige bestimmte Substanzen, wie z.B. Antibiotika, Veränderungen in der Erscheinungshäufigkeit des X-Chromatins verursachen können (PLATT, 1964; TAYLOR, 1963; SCHVAL u. CASSELMAN, 1961), lassen den Schluß zu, daß die mehr oder weniger Spiralisierung des X-Chromosoms⁺) in direktem Zusammenhang mit metabolischen Veränderungen der

⁺) Immer unter der Annahme, dass das Geschlechtschromatin aus dem heteropyknotischen, spiralisierten X-Chromosom entsteht, wie es im folgenden Abschnitt ausführlicher erläutert wird.

Zellen steht. Die Sichtbarkeit des Geschlechtschromatins im Nucleus scheint also unabhängig von der DNS-Synthese zu sein, wie jedoch MILES (1960), THERKELSEN und PETERSEN (1962) behaupten. Diese Autoren stellten eine Abnahme der Geschlechtschromatinhäufigkeit während der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen *in vitro* fest. Daher könnte man deduzieren, daß das heteropyknotische, in der Interphase als X-Chromatin sichtbare X-Chromosom während der DNS-Synthese (S-Phase) sich als ganzes entspiralisiert, um sich replizieren zu können.

Im Widerspruch damit steht die Erfahrung von KLINGER und Mitarbeitern (1968). Sie fanden heraus, daß die Häufigkeit von Chromatin-positiven Nuclei in einer Zellkultur in engem Zusammenhang mit der Zelldichte pro Einheitsfläche steht, aber in keinem Verhältnis mit der Teilungsgeschwindigkeit der Zellen oder mit der Geschwindigkeit der Dichtezunahme der Zellen steht.

Noch gegen das Resultat von MILES et al. spricht der Versuch von WOLF und Mitarbeitern (1965). Mit Hilfe von ^3H Thymidine bewiesen sie, daß das Geschlechtschromatin deutlich identifizierbar in Nuclei während der DNS-Synthese ist.

Auf der Basis solcher Beobachtungen entwarf MOORE (1966a) eine Arbeitshypothese, wonach sich das Geschlechtschromatin während der Interphase als Folge von noch unbekannten Stimuli entspiralisiert und in dieser Zeitspanne genetisch aktiv in der Zelle sein kann. Nach der Erfüllung seiner Funktion spiralisiert es sich wieder, so daß in

dem Nucleus von neuem das typische X-Chromatinbild erscheint. Diese Hypothese würde eine Erklärung für die Veränderungen der Geschlechtschromatinhäufigkeit in verschiedenen Geweben und in unterschiedlichen Entwicklungsstufen bieten, wie auch für solche Beobachtungen, die auf eine genetische Aktivität von beiden X-Chromosomen in weiblichen Nuclei deuten.

Zu diesen Beobachtungen zählt z.B. die Feststellung phänischer Unterschiede zwischen normalen XX Frauen und XO Patientinnen, die nicht vorhanden wären, wenn eines der beiden X-Chromosomen genetisch immer bzw. völlig inaktiv wäre. EPSTEIN (1972) stellte fest, daß beide X-Chromosomen der Oocyten weiblicher Mäuse genetisch aktiv sind. Er maß nämlich die Aktivität der X-gebundenen Enzyme Glukose-6-Phosphatase-Dehydrogenase und Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase in XX bzw. XO Oocyten weiblicher Mäuse. In den ersten Oocyten ist die enzymatische Aktivität genau doppelt so hoch wie in den zweiten. Der LYON'sche Kompensationsmechanismus scheint also für diese Zellen nicht gültig zu sein. Für eine genetische Aktivität der beiden X-Chromosomen spricht auch der Versuch von BACK und DÖRMER (1967), bei dem die ^3H -Uridinmarkierung des RNS zeigte, daß in Lymphocytenkulturen alle Chromosomen weiblicher Testpersonen, die beiden X eingeschlossen, RNS bildeten.

1.3. Entstehung des Geschlechtschromatins

OHNO et al. vertraten in ihrer Arbeit (1959) die Meinung, daß das X-Chromatin der weiblichen somatischen Interphasennuclei ein einziges X-Chromosom sei, das sich in seiner ganzen Länge verdichtet habe.

Die Bildung des Geschlechtschromatins aus dem heteropyknotischen X-Chromosom wurde nochmal von OHNO in Zusammenarbeit mit MAKINO (1961a) bei den Untersuchungen an Interphasen- und Prophasenzellkernen von somatischen Zellen beobachtet. Die beiden Wissenschaftler, die einen vier Monate alten Fötus studierten, bewiesen, daß das Interphasengeschlechtschromatin in weiblichen Wesen ein einziges frühreifes verdichtetes X-Chromosom in der Prophase darstellt. Dieses Chromosom scheint einheitlich an seiner ganzen Länge verdichtet zu sein.

Ein weiterer Beweis für den X-chromosomalen Ursprung des X-Chromatins wurde durch die Untersuchung der DNS-Synthese in der S-Phase mit Hilfe von ^3H -Thymidin und Autoradiographie geliefert (GILBERT, MULDAL, LAJTHA, ROWLI, 1962; MOORHEAD, DEFENDI, 1963; GERMAN, 1964). Man sah, daß ein Chromosom mit der Morphologie von einem X in der S-Phase der Interphase später als die anderen Chromosomen replizierte. Die Radioaktivität des spätreplizierenden, heteropyknotischen X-Chromosoms ist auf das X-Chromatin der Interphase konzentriert, die der Interphase folgt, in welcher die Zelle mit ^3H -Thymidin gefüttert wurde.

Der sexuelle Dimorphismus der Interphasennuclei bei Säugetieren (Anwesenheit des X-Chromatins bei weiblichen We-

sen, Abwesenheit desselben bei männlichen Wesen) ist dem ambivalenten Verhalten des X-Chromosoms zuzuschreiben. In den Somazellen zeigt eines der beiden X-Chromosomen beim weiblichen Säugetier seine heterochromatische Natur, indem es das Geschlechtschromatin bildet, dagegen verhalten sich das 2. X-Chromosom bei der Frau und das einzige X-Chromosom bei dem Man euchromatisch, indem sie kein X-Chromatin bilden.

Nach OHNO et al. (1964) besteht in diesem ambivalenten Verhalten des X-Chromosoms bei Säugetieren der Mechanismus, der ein konstantes Verhältnis zwischen dem funktionellen, aktiven X-Chromosom und den Autosomen in den Somazellen hält.

Beide X-Chromosomen in den weiblichen Säugetieren tragen Gene, die den Metabolismus und die Funktion der Zelle bestimmen aber nicht in direkter Beziehung mit der sexuellen Entwicklung stehen. Die weibliche Zelle ihrerseits braucht nur ein X-Chromosom für die Erfüllung ihrer Funktion und für den Stoffwechsel (MOORE, 1966b). Das gebrauchte X-Chromosom ist das aktive, euchromatische, isopyknotische X. Zusätzliche X-Chromosomen sind für den Stoffwechsel überflüssig und funktionell träge, nach der LYON-Hypothese werden sie als genetisch inaktiv erklärt, zeigen ein heterochromatisches und heteropyknotisches Bild und bilden das Geschlechtschromatin der Interphasennuclei. Die Erklärung, warum sich eine weibliche Somazelle für ihre Funktion und ihren Metabolismus mit einem X-Chromosom begnügt, ist wahrscheinlich in der Evolutionsgeschich-

te des primitiven Sexchromosomenpaares zu finden(MOORE, 1966b).

Die X-Gene haben sich bei männlichen Wesen stufenweise an den hemizygotischen Zustand anpassen müssen, weil die starke Spezialisierung des Y-Chromosoms das X-Chromosom bei den männlichen Säugetieren dazu gezwungen hat, in einem monosomischen Zustand zu existieren. Diese erfolgreiche Anpassung führte zu wachsender genetischer Ungleichheit zwischen Mann (mit einem X) und Frau (mit zwei X). Weil eine doppelte Dosis von X-verbundenen in dem hemizygotischen Zustand völlig wirkenden Genen ein Ungleichgewicht hervorruft, bildete sich ein entsprechender Kompensationsmechanismus, der sich eben in dem ambivalenten Verhalten des X-Chromosoms ausdrückt.

Unter der Voraussetzung, daß sich das Geschlechtschromatin aus einem ganzen X-Chromosom bildet, schlug LYON (1961) eine Hypothese vor (LYON-Hypothese, vgl. oben), die die Beschaffenheit dieses Kompensationsmechanismus bei den Säugetieren erklären soll.

Ihre Hypothese besteht aus drei Punkten.

1. Eines der beiden X-Chromosomen in den Somazellen eines weiblichen normalen Wesens ist genetisch inaktiv.
2. Das inaktive X-Chromosom kann entweder das mütterliche oder das väterliche X in unterschiedlichen Zellen des gleichen Wesens sein.

Daher kommt es, daß das weibliche Säugetier ein natürliches Mosaik mit zwei verschiedenen somatischen Zellpopulationen ist, die eine mit einem aktiven X mütterlichen

Ursprungs, die andere mit einem aktiven X väterlichen Ursprungs.

3. Die X-Inaktivierung findet in der frühen embryonalen Entwicklung statt und bleibt das ganze Leben lang für die zukünftige Entwicklung jeglicher zellulären Linie fixiert.

Wann genau diese Inaktivierung stattfindet, das heißt, ab welchem Moment der embryonalen Entwicklung sich das X-Chromatin in den Zellen sichtbar macht, ist nicht genau bekannt. OHNO (1962a) fand ein heteropyknotisches X im 6. Schwangerschaftstag. PARK (1957) war in der Lage, das Geschlechtschromatin bei einem menschlichen Fötus im Trophoblastus ab dem 12. Schwangerschaftstag und im Embryo ab dem 16. Tag zu unterscheiden. Bei *Macacus* erhielt er als entsprechende Ergebnisse den 10. und den 19. Tragzeitstag.

Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, daß die Differenzierung des X-Chromatins vor der Differenzierung der Keimdrüsen zu datieren ist. Aber wenn die Anwesenheit des Geschlechtschromatins auf ein genetisch inaktives X-Chromosom deutet, dann muß dieses inaktive X schon vor dem 6. oder 16. Schwangerschaftstag als "female determiner" operiert haben. Es ist natürlich auch denkbar, daß dieses heterochromatische X, obwohl nach dem 6. oder 16. Schwangerschaftstag heteropyknotisch, trotzdem genetisch aktiv sein kann. Noch andere Alternativen sind, daß ein Umschaltmechanismus existiert, dank

dessen das inaktive X zur Zeit der Geschlechtsbestimmung aktiviert wird, oder daß die " female determination " nur ein aktives X-Chromosom braucht (HAMERTON, 1968).

1.4. Korrelation zwischen der Geschlechtschromatin- und der X-Chromosomenanzahl

Die Korrelation zwischen der Geschlechtschromatin- und der X-Chromosomenanzahl ist durch Untersuchungen von Individuen klargemacht worden, die eine abnorme X-Chromosomenanzahl besaßen (vgl. Tabelle 1 Anhang S. 74). Solche Untersuchungen stützen die These, wonach das Geschlechtschromatin von einem ganzen X-Chromosom bei normalen weiblichen Wesen gebildet wird, und sprechen somit auch für die LYON-Hypothese. Die beobachteten Korrelationen sind bei klinischen Fällen dokumentiert worden und von ihnen kann man deduzieren, daß die höchste Anzahl der in einer Zelle anwesenden Heterochromatinmassen gleich der um 1 verminderten Anzahl der in der gleichen Zelle anwesenden X-Chromosomen ist. Die einzige Ausnahme dieser Regel ist bei GRUMBACH et al. (1960) gegeben. Sie fanden Chromatinpositive Nuclei bei einer XO Frau mit Gonadendysgenesie. Bei der Analyse der klinischen Beobachtungen merkt man, daß, wenn ein euchromatisches und genetisch aktives X-Chromosom anwesend ist, alle andere anwesende zusätzliche X-Chromosomen heteropyknotisch werden und sich aus jedem von diesen eine Heterochromatinmasse bildet. Mit anderen Worten scheint es eine Zusammenwirkung unter den X-Chromosomen zu geben, die die Heteropyknose in allen X-Chromosomen mit Ausnahme eines einzigen hervorruft.

1.5. Geschlechtsdimorphismus in den Leukocyten

DAVIDSON und SMITH (1954) beobachteten einen morphologischen Unterschied zwischen weiblichen und männlichen polymorphonuclearen Leukocyten im Blut. Bei Frauen erscheint ein kleiner nach Form und Maß charakteristischer Anhängsel, der drumstick genannt wird. Bei Männern kann man Formationen finden, die sehr den drumsticks ähneln, aber eine genauere Untersuchung zeigt immer, daß sie nicht nach Maß und Form mit den "weiblichen" drumsticks total übereinstimmen. Der Durchmesser der "echten" drumsticks schwankt zwischen $1,4 - 1,6 \mu$ (MOORE, 1966c), der Kopf solcher Gebilde kann oval oder rund sein und ist durch einen sehr dünnen, mehr oder weniger langen Faden mit dem Zellkern verbunden. Ihr Chromatin, das mindestens so dicht ist wie das des Kernes, ist in Klumpen angeordnet. Die Drumstickshäufigkeit beträgt ungefähr 1 drumstick auf 36 Leukocyten mit einem breiten Spielraum von 1 auf 5 bis 1 auf 300 (MOORE, 1966d).

Drumsticks wurden von DAVIDSON (1960, 1961) in vivo beobachtet. Er sah im Phasenkontrastbild, daß während der Zellteilung eine kleine, dichte, inaktive Chromatinmasse vom Zellkern herausgedrückt wird und an einem dünnen Faden hängenbleibt. In Widerspruch damit steht die Erfahrung von KÜBBERLING (1966). Die Ergebnisse seiner Beobachtungen lebender Zellen in Phasenkontrast sprechen dafür, daß drumsticks in der lebenden Zelle nicht vorkommen. Er hat herausgefunden, daß bei Ausbreitungs-methoden für Granulocyten, die das Ausstreichen auf dem

Objektträger umgehen, die Häufigkeit der drumsticks nur ein Fünftel des Durchschnittswertes in normalen Blutaussstrichen derselben Versuchspersonen beträgt. Deswegen ist, wie er sagt, " anzunehmen, daß die Häufigkeit, in der die geschlechtsspezifischen Chromatinkomplexe im Ausstrich als drumsticks erscheinen, in stärkerem Maß von der physiko-chemischen Beschaffenheit von Kern und Plasma abhängt. Die individuellen Schwankungen der Drumstickshäufigkeit, die nicht mit Schwankungen in der Häufigkeit der Geschlechtschromatine anderer Zellen einergeben, und die Zunahme der drumsticks in Laufe der Zellreifung könnten ihre Erklärung in unterschiedlichen Viscositätsverhältnisse von Kern und Plasma finden ". Die Tatsache, daß Zellen mit drumsticks auf dem Objektträger dazu neigen, sich in gewissen Zonen zu sammeln - nämlich am Rand des Ausstriches - spricht dafür, daß physikalische Kräfte eine Rolle während der Ausbreitung des Blutfilmes spielen. Zwei Erklärungen sind also für die Entstehung der drumsticks in Betracht gezogen worden: ein Abstoßungsphänomen nach DAVIDSON, wenn nach der Teilungsphase das Sexchromatin⁺⁾ nicht mehr gebraucht wird - diese Anschauung würde die Theorie stützen, daß das Heterochromatin ein inaktives Chromosom darstellt (SIRKS, 1956) -, und eine funktionelle Anpassung nach KÖBBERLING, wobei die Chromosomen in näherem Kontakt mit den Zytoplasmatischen

⁺⁾ Unter der Annahme, daß der drumstick das heteropyknotische X-Chromosom darstellt, das in den anderen Geweben als Geschlechtschromatin zu sehen ist.

Elementen gebracht werden.

Nach MITTWOCH (1961) steht die Drumstickshäufigkeit unter dem Einfluß dreier Variablen: die Lappenanzahl, das Individuum, und das Stadium des Menstruationszyklus. Bei normalen Frauen besteht eine direkte Korrelation zwischen der Lappenanzahl und der Drumstickshäufigkeit. Außerdem besteht vielleicht auch eine hereditäre Disposition, die die Drumstickshäufigkeit beeinflusst, obwohl Versuche, eine solche Disposition für die verschiedenen Häufigkeiten der drumsticks nachzuweisen, bislang nicht überzeugend waren (OVERZIER, 1961a). Die Drumstickshäufigkeit kann auch mit dem Menstruationsstadium zusammenhängen, anders ausgedrückt, mit dem Hormonenniveau (CARATZALI, 1963). Eine hormonelle Behandlung mit ACTH oder Insulin scheint die Drumstickshäufigkeit beeinflusst zu haben (CARATZALI und PHLEPS, 1958).

Es wurde angenommen, daß die drumsticks das Heterochromatin des XX-Paares enthalten, wenn nicht sogar die gesamten Chromosomen (GRUMBACH u. BARR, 1958). Um diese Annahme zu beweisen, wurden die Kerne und die aus kurzfristigen Knochenmarkskulturen präparierten Chromosomen unter Standardbedingungen photographiert. Die Bilder wurden dann ausgeschnitten und in Gruppen gewogen. Hierbei kam man zu dem Ergebnis, daß das Verhältnis des drumsticks zum Kern in normalen Neutrophilen 1:34, das Verhältnis des Sexchromosomenpaares zu allen Chromosomen 1:18 ist (DAVIDSON u. FLUTE, 1962). Die beiden Wissenschaftler kamen zu dem Schluß, daß ein drumstick ungefähr die Hälfte

des Chromatins des XX-Paares enthält. Das würde bedeuten, daß der drumstick ein X-Chromosom enthält. daß es sich um das heteropyknotische X-Chromosom handelt, ist eigentlich nicht eindeutig bewiesen.

Die Drumstickshäufigkeit ist zweifellos mehr abhängig von äußeren Einflüssen unterschiedlicher Natur als die Geschlechtschromatinhäufigkeit der anderen Gewebe und ihre Häufigkeitsschwankungen stimmen nicht mit Schwankungen des X-Chromatins anderer Zellen überein. Die drumsticks erscheinen außerdem mit einer viel niedrigeren Häufigkeit im Blut als das Geschlechtschromatin in den anderen Geweben. Wegen des unregelmäßigen Verhaltens der drumsticks, können die an ihnen gemachten Beobachtungen sehr verschiedenartig ausfallen.

Ob der drumstick in Ursprung und Funktion identisch mit dem X-Chromatin der anderen Gewebe ist, ist ziemlich zweifelhaft, und auch wenn einige Wissenschaftler annehmen, daß die drumsticks das heteropyknotische X-Chromosom enthalten, darf man die Tatsache nicht vernachlässigen, daß keine enge Korrelation zwischen der X-Chromosomenanzahl und der Drumsticksanzahl gefunden worden ist, wie sie für das Geschlechtschromatin gültig ist. Was bis jetzt als unbestreitbar erscheint, ist, daß die drumsticks jedenfalls ein Geschlechtsmerkmal des Zellkernes sind (HAMERTON, 1971).

1.6. Heterochromatin und Geninaktivierung

LYON (1961; 1962a,b; 1963) hat auf Grund von Beobachtungen an Mäusen eine Hypothese entwickelt, nach der in jeder Zelle eines weiblichen Tieres nur eines der beiden X-Chromosomen funktionell aktiv ist, während das andere inaktiviert wird.

Zu der Überzeugung, daß ein X inaktiv ist, und das die Wahl des zu inaktivierenden X-Chromosoms total zufällig fällt, gelangte LYON durch zwei Beobachtungen an weiblichen Mäusen.

1. Der normale Phänotyp der 39,X weiblichen Mäusen zeigt, daß nur ein X bei diesen Tieren für eine normale Entwicklung nötig ist.

2. " Weibliche Mäuse, die für zwei verschiedenen X-chromosomale Genloci heterozygot sind, von denen einer die Fellfarbe, der andere die Haarsrtuktur beeinflusst, zeigen folgendes Verhalten: wenn die beiden abnormen Gene auf dem gleichen X-Chromosom liegen, so weist das Fell farblich und strukturell veränderte Bezirke neben normalen auf. Liegen die beiden Gene dagegen auf verschiedenen X-Chromosomen, so haben die Tiere keine normalen Fellbezirke, sondern nur in der Farbe veränderte neben nur in der Haarstruktur veränderten Bezirken, aber keine in Farbe und Struktur gleichzeitig abnormen und keine in beider Hinsicht normalen. Die Musterung entsteht dadurch, daß im Blastozytenstadium, etwa zwischen dem 12. und 16. Tag nach der Befruchtung, für jede Zelle festgelegt wird, welches der beiden X-Chromosomen aktiv und

welches inaktiv wird. Die einmal festgelegte Aktivität oder Inaktivität wird denn in allen folgenden Zellteilungen von den Tochterchromosomen beibehalten. Die streifigen Muster entsprechen den Richtungen der Zellvermehrung" (LENZ, 1970a). Die Ausweitung der LYON-Hypothese auf die Menschen gründet sich auf cytologische und genetische Befunde. Erstens die cytologische Korrelation zwischen der X-Chromosomenanzahl und der X-Chromatinanzahl, zweitens die genetischen Beobachtungen an einigen X-verbundenen Genen.

LYON (1962b) arbeitete an weiblichen menschlichen Heterozygoten für einige X-gekoppelte Gene wie Rotgrünblindheit, Hämophilie, retinitis pigmentosa etc. und stellte fest, daß die gefundenen Resultate nicht der "zufälligen X-Inaktivierungshypothese" widersprechen.

Vier X-gekoppelte Gene wurden von anderen Wissenschaftlern grundlich erforscht: Mangel an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) von BEUTLER et al. (1962), Mangel an Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) von ROSENBLOOM, KELLEY, HENDERSON u. SEEGMILLER (1967) und von FUJIMOTO, SEEGMILLER, UHLENDORF, JACOBSEN (1968), das Hunter-Hurler-Syndrom (Mukopolysaccharidose Typ II) von DANES und BEARN (1965, 1966) und die Blutgruppe Xga von MACDIARMID et al. (1967).

Bei allen diesen vier Fällen hat man die Existenz eines Mosaiks auf der zellulären Ebene als Folge der Inaktivierung eines der beiden X feststellen können.

Aber wenn die LYON-Hypothese uneingeschränkt gelten wür-

de, so wäre ein phänischer Unterschied weder zwischen normalen Frauen mit zwei X und XO Patientinnen, noch zwischen normalen Männern und Patienten mit XXY-KLINE-FELTER-Syndrom vorhanden. Im Gegenteil werden die Anomalien desto markanter, je mehr die Anzahl der überzähligen X-Chromosomen von XXY bis XXXXY zunimmt. Das spricht dafür, daß das zweite heterochromatische X doch nicht völlig inaktiv in jeglichem Entwicklungsstadium sein kann. Mögliche Erklärungen für die existierenden phänischen Abnormitäten sind folgende:

1. man hat festgestellt, daß das Geschlechtschromatin nicht vor dem 10. oder 16. Schwangerschaftstag zu sehen ist. Das könnte bedeuten (HAMERTON, 1968), daß vor dem 10. oder 16. Tag beide X bei einer normalen Frau für eine normale Entwicklung verlangt werden. Wenn das stimmt, dann könnten chromosomische Unausgeglichenheit während der ersten 10 oder 16 Tage zu abnormen Phänotypen führen.

HAMERTON (1968) vermutet, daß das zweite X der Frau und das Y des Mannes in erster Linie durch ihr Heterochromatin wirken, das nicht nur zur Inaktivierung von Genloci dient, sondern auch zur Einführung von "controlling elements" in die Zelle. Diese "controlling elements" wirken nach einem Operon-ähnlichen Modell auf Gene, die für die Geschlechtsbestimmung und für die Entwicklung verantwortlich sind sowie für einige somatische Eigenschaften, Größe und psychosoziale Entwicklung eingeschlossen, und vielleicht im Falle des Y-Chromosoms auch für die Sper-

matogenese. Die Tabelle 2 (vgl. Anhang S.71) zeigt, daß sich in allen Fällen mit der Aneuploidie der Geschlechtschromosomen die Heterochromatinmenge ändert, während die Euchromatinmenge konstant bleibt. Das deutet darauf hin, daß gerade diese Unausgeglichenheit der heterochromatischen "controlling centers" den abnormen Phänotyp verursacht.

Wenn die Hypothese HAMERTONS richtig ist, dann würde das X-Heterochromatin der Frau zwei Zwecken dienen: der Dosiskompensation der überflüssigen Gene und der Einführung in die Zelle von "controlling elements".

2. Die zweite mögliche Erklärung des abnormen Phänotyps, wenn Aneuploidie der Sexchromosomen vorliegt, ist die unvollständige Inaktivierung des "inaktiven" X-Chromosoms entweder in einigen Geweben oder in einigen Stadien des mitotischen Zyklus (THERKELSEN, 1964; LYON, 1966).

Die ^3H -Uridinmarkierung der RNS hat gezeigt, daß in Lymphocytenkulturen alle Chromosomen weiblicher Individuen, also auch beide X-Chromosomen, RNS bilden, was als Zeichen der genetischen Aktivität angesehen wird (BACK u. DÖRMER, 1967).

OHNO et al. (1961b, 1962b) haben festgestellt, daß in Oocyten beide X-Chromosomen euchromatisch sind, was für ihre Aktivität spricht. Das impliziert, daß Individuen mit Anomalien der X-Chromosomenanzahl eine falsche Dosierung der X-Gene in den Keimzellen haben, was wahrscheinlich ihre Sterilität erklärt.

Es ist festgestellt worden, daß Individuen mit strukturellen Anomalien des X-Chromosoms ein morphologisch ab-

mormes Geschlechtschromatin in allen ihren Zellen zeigen (LINDSTEN, 1963; MACLEAN, 1962). Das bedeutet, daß das Heterochromatin bei solchen Fällen aus dem abnormen X-Chromosom gebildet wird und daß das spätreplizierende X-Chromosom dasjenige abnorme X in allen Zellen ist. Hier findet also keine "zufällige" X-Inaktivierung statt und das normale X ist dann auch das aktive X in allen Zellen.

Eine detaillierte Kritik an der LYON-Hypothese wurde von GRÜNEBERG (1966a,b; 1967) geübt. Er "hat durch sorgfältige Untersuchungen zu zeigen versucht, daß die Haarstruktur und -pigmentierung und die Zähne von Mäusen, die heterozygot für verschiedene X-chromosomale Gene waren, nicht die nach der LYON-Hypothese zu fordernden scharf abgegrenzten, zufällig verteilten Areale zeigen. Die Bedeutung der GRÜNEBERG-Kritik liegt weniger darin, daß sie die LYON-Hypothese widerlegt hätte, als darin, daß sie dazu zwingt, die Voraussetzungen und Konsequenzen der LYON-Hypothese schärfer zu durchdenken und durch genauere Untersuchungen zu klären" (LENZ, 1970b).

2. Problemstellung und Arbeitshypothese

2.1. Arbeitshypothese und ihre Begründung

Wie in den Abschnitten 1.3. und 1.6. der Einleitung angeführt wurde, postuliert die LYON-Hypothese die Anwesenheit eines genetisch inaktiven X-Chromosoms in jeder Zelle der Organismen weiblicher Säugetiere. Die X-Inaktivierung findet in der frühen embryonalen Zeit statt und wird von der Mutterzelle auf die Tochterzellen für die gesamte Lebensdauer des Organismus übertragen. Die tatsächliche Existenz eines inaktiven X-Chromosoms in allen Zellen eines weiblichen Individuums ist durch zahlreiche Experimente bewiesen worden (vgl. 1.6.). Trotzdem zeigt es nicht in jeder Zelle eines jeden Gewebes gleichzeitig heteropyknose, was man aus der Tatsache ableiten kann, daß manchmal bis zu 80 % Chromatin-negativer Zellkerne in einem Gewebe zu finden sind. Aber auch in solchen Nuclei ohne Sexchromatin ist von BEUTLER und Mitarbeitern (1962), LINDER u. GARTLER (1965), ROSEN-BLOOM et al. (1967) sowie COMINGS (1966) die Präsenz eines genetisch inaktiven X-Chromosoms nachgewiesen worden, wie nach der LYON-Hypothese zu erwarten war. Diese Hypothese kann also nicht erklären, warum in einigen Zellen das inaktive X nicht gleichzeitig heteropyknotisch und heterochromatisch ist.

Ein Versuch, diese Beobachtung zu erklären, könnte vorgenommen werden, indem man die Existenz von - beim jetzigen Kenntnisstand noch unbekannten - Faktoren annimmt, die die Heteropyknose in allen Geweben bestimmen. Diese

Annahme erscheint nicht willkürlich, wenn man sich an den Abschnitt 1.2.3. der Einleitung erinnert, in dem von der Arbeitshypothese MOORES (1966) berichtet wurde, wonach sich das Geschlechtschromatin während der Interphase als Folge von noch unbekannten Stimuli entspiralisiert und in dieser Zeitspanne genetisch aktiv sein kann. Solche Stimuli könnten endogener Natur sein, z.B. der Hormonspiegel - wie es hinsichtlich der drumsticks (vgl. 1.5.) von CARATZALI und PHLEPS (1958), MITTWOCH (1961) und CARATZALI (1963) und hinsichtlich des Geschlechtschromatins der Mundschleimhautnuclei von HAGY und BRODRICK (1972) nachgewiesen wurde - und/oder exogener Natur, z.B. Umweltfaktoren wie Meereshöhe, Temperatur etc.

Ein Studium solcher endogenen und exogenen Faktoren bezüglich der Geschlechtschromatinhäufigkeit wäre äußerst interessant, soll aber nicht Aufgabe dieser Arbeit sein. Unter der Voraussetzung, daß 1. diese Faktoren zu jedem Zeitpunkt ungefähr gleich stark auf alle Gewebe der einzelnen Individuen einwirken und 2. in unterschiedlichem Maße bei den einzelnen Individuen, so daß die Beobachteten Anteilswerte bei der Untersuchung einer Gruppe von Frauen voneinander abweichen, muß eine hohe positive Korrelation zwischen den Anteilswerten an Chromatin-positiven Nuclei der verschiedenen Gewebe bestehen. Diese Folgerung bildet meine Arbeitshypothese. Da ich in dieser Arbeit nur drei verschiedene Gewebe untersuche, nämlich Haarwurzeln, Mundschleimhaut und Blut, lautet meine Ar-

beitshypothese, daß Frauen mit einem hohen/niedrigen Anteilswert an Chromatin-positiven Haarwurzelzellen auch entsprechend hohe /niedrige Anteilswerte bei den beiden übrigen Geweben aufweisen.

Die 1. Voraussetzung beinhaltet, daß alle Gewebe eines Organismus, die im gleichen Moment seines Lebenszyklus untersucht werden, ungefähr die gleichen Häufigkeiten an Chromatin-positiven Zellkernen aufweisen oder daß die gleichstarken Einwirkungen der Faktoren in den einzelnen Geweben eines gleichen Individuums zwar verschiedene Reaktionen hervorrufen, die zu unterschiedlichen Anteilswerten in diesen Geweben führen, aber diese Unterschiede für alle Organismen ungefähr relativ gleich sein lassen⁺). Bei jeder Frau müßten dann die Anteilswerte Chromatin-positiver Zellkerne bei Mundschleimhaut, Blut und Haarwurzeln im gleichen Verhältnis zueinanderstehen. Auf die Problematik dieser beiden Alternativen wird im Verlauf der Arbeit noch eingegangen. Kleinere Abweichungen von den durch diese Annahmen erwarteten Resultate sind auf technische Faktoren zurückzuführen, d.h. auf die verschiedenartige Beschaffenheit der Zellen in den einzelnen Geweben, die bei unterschiedlichen mechanischen Stimuli diverse Reaktionen hervorruft und auf den möglichen Fall,

⁺) es wären auch gleiche absolute Unterschiede der Anteilswerte denkbar -was aber bei 50 Frauen recht unwahrscheinlich ist- oder willkürliche Unterschiede, dann ist jedoch eine hohe Korrelation sehr zufällig. Deswegen sollen die Annahmen nicht gelten.

daß in einigen Nuclei das Geschlechtschromatin, obwohl anwesend, nicht sichtbar ist, weil es seitlich ganz zusammengedrückt an der Kernmembrane haftet.

Die 2. Voraussetzung findet ihre Begründung in ziemlich ausgeprägten Häufigkeitsschwankungen Chromatin-positiver Zellen bei einem bestimmten Gewebe innerhalb einer Gruppe von Testpersonen, wie sie zahlreichen Publikationen entnommen werden kann⁺). Eine Erklärung hierfür wäre, daß die von mir angenommenen Faktoren ihre Einflußstärke im Zeitablauf ändern, wie man von der Tatsache deduzieren kann, daß divergierende Häufigkeiten Chromatin-positiver Zellkerne bei gleichartigen Geweben eines Organismus während unterschiedlicher Entwicklungsstufen beobachtbar sind (vgl. Abschnitt 1.2.3.).

⁺) OVERZIER (1961b); KÖBBERLING (1966); MOORE (1966e); CURTIS (1969) etc.

2.2. Praktische Bedeutung des Geschlechtschromatins

Das Interesse am X-Chromatin begründet sich in seiner Wichtigkeit im klinischen und diagnostischen Feld. Das Vorhandensein oder das Fehlen des Sexchromatins in den Nuclei eines Patienten leistet große Hilfe bei der Differentialdiagnose von Geschlechtsanomalien wie der testikulären Feminisierung (chromatinnegativ), dem TURNER-Syndrom und der Gonadendysgenese (deren Mehrzahl chromatinnegativ ist) und dem KLINEFELTER-Syndrom, das meistens chromatinpositiv ist. Der Geschlechtschromatintest ist außerdem besonders wertvoll für eine sichere Unterscheidung des männlichen und weiblichen Pseudohermaphroditismus, denn die Nuclei sind chromatinnegativ bei dem ersten und chromatinpositiv bei dem letzten. Bei Patienten mit Geschlechtsanomalien sind die Epithelzellen hinsichtlich des X-Chromatins und die Leukocyten hinsichtlich der drumsticks zu untersuchen. Eine Geschlechtschromatinuntersuchung des Fruchtwassers bei schwangeren Frauen erlaubt eine Pränatale Diagnose des Geschlechts des Fötus, was im Falle geschlechtsgebundener Erbkrankheiten von großer Wichtigkeit sein kann (CEDERQVIST u. FUCHS, 1971; V. LENTI et al., 1972; GOLDSTEIN et al., 1973).

Das Geschlechtschromatin läßt sich gut an Epithelzellen untersuchen. Die Methode der Mundschleimhautabstriche hat sich wegen ihrer Einfachheit in der Laborpraxis gut eingebürgert. Sie ist auch bei Neugeborenen brauchbar. Leider haben die Kerne solcher Abstriche gewisse ungünstige Eigenschaften. Sie sind öfters degeneriert und zeigen

Pyknose. Ein besseres X-Chromatinbild bekommt man bei Haarwurzelpreparaten. Ihre Anfertigung ist sehr leicht und nimmt wenig Zeit in Anspruch. Die Präparate sind normalerweise sauber und das Geschlechtschromatin ist deutlich gefärbt.

Eine andere Untersuchungsmethode ist die Drumsticksmethode mit Hilfe von Blutabstrichen. Sie zeigen einige Nachteile, wie das nicht seltene Mißlingen der Färbung, die nicht immer optimale Erkennbarkeit der drumsticks und der Zeitaufwand. Man muß nämlich mindestens 500 Granulozyten untersuchen, um eine sichere Geschlechtsdiagnose aufstellen zu können. Geschlechtschromatinuntersuchungen können auch an Hautbiopsien, Knochenmarkzellkulturen und vaginaler Schleimhaut vorgenommen werden.

Von allen diesen Methoden bleibt der Haarwurzelastrich der praktischste und einfachste. Dank seiner Vorteile ist er als "routine"-Methode während der letzten Olympiade für die Geschlechtsüberprüfung der Athletinnen eingesetzt worden.

Auf den Haarwurzelpreparaten ist es auch möglich, das Y-Chromosom mit der Fluoreszenz-Methode nach Quinacrin-Hydrochlorid- oder Athebrin-Färbung (SPERLING, 1971; SCHWINGER et al., 1971) zu identifizieren, was eine optimale Ersetzung der Chromosomenuntersuchungen im Falle von einigen Geschlechtsanomalien (XXY, XYY, XXYY) darstellt. Solche Untersuchungen haben sich nämlich als unmögliche "routine"-Methode wegen ihres Zeitaufwands und Kosten erwiesen.

3. Material und Methoden

3.1. Technische Ausführung der Abstriche

Bei 50 Frauen wurden ein Abstrich aus der Haarwurzel, zwei aus der Mundschleimhaut und einer aus dem peripheren Blut entnommen. Der zweite Abstrich aus der Mundschleimhaut war als Reserve gedacht, weil, wie die Praxis gezeigt hat, es bei diesem Merkmal öfters passieren kann, daß die Präparate nicht gelingen. Ursache dafür kann ein dichter Film auf dem Objektträger sein, so daß die Zellkerne aufeinanderliegen, oder die Abwesenheit von ausreichend gut auswertbaren Zellkernen. Als gut auswertbar werden die Zellkerne angesehen, die eine intakte und glatte Kernmembrane zeigen, die nicht von überliegenden Zellkernen ganz oder auch teilweise bedeckt wird. Außerdem muß das unmittelbar an der Zellkernmembrane liegende X-Chromatin dunkel gefärbt und scharf konturiert sein. Vakuolisierte und grobkörnige Zellkerne wurden nicht ausgewertet, weil sie zu degenerierten Zellen gehören. Das gleiche Kriterium gilt auch für die Haarwurzelzellen. Bei den Mundschleimhautabstrichen kommen zudem fast immer Bakterien vor, die das Bild stark stören und deren Häufigkeit zwar vom Mangel an Mundhygiene oder von Mundinfektionen abhängt, die aber in kleinen Mengen zur normalen Ausstattung der Mundschleimhautzellen gehören. Von Granulocyten wurden auch intakte und gut gefärbte Zellkernen gesucht und diejenigen ausgewertet, die ein deutliches und typisches drumstick zeigten. Als echte drumsticks galten solche Gebilde, die durch einen sehr dünnen, mehr oder weniger langen Faden mit dem

Zellkern verbunden sind und deren Kopf oval oder rund ist mit einem Durchmesser, der zwischen $1,4\mu$ und $1,6\mu$ schwankt. Ihr Chromatin ist in Klumpen angeordnet und ist mindestens so dicht wie das des Kernes. Die dubiosen Formen wurden ausgelassen. Vom Blut wurden außer den drumsticks, den sogenannten A-Körperchen, auch die "nodules sexiles" oder B-Körperchen untersucht. Das "nodule sexile" besteht aus einem dicken, runden, auf dem Nucleus aufsitzenden Knoten, dessen Größe gleich mit der der Drumstickköpfe ist. Es kann auch durch einen sehr kurzen und dicken Hals mit dem Zellkern verbunden sein. C-Körperchen wurden ebenfalls examiniert. Sie sind solche vom Nucleus ausgehende Formationen, die weder zu A noch zu B gehören. Ihr Aussehen kann ziemlich verschieden sein, entweder das eines relativ langen, mehr oder weniger dicken, leicht bis stark gebogenen Fadens oder das, welches einer Speerspitze ähnelt. Die B- und C-Körperchen sind nicht im strengen Sinn geschlechtsspezifisch.

Es wurden $500^{+)}$ Zellkerne pro Merkmal und Testperson ausgewertet, mit der Absicht, die Anteilswerte der Zellkerne mit Sexchromatin bzw. mit drumsticks an der Gesamtzahl der Zellkerne zu ermitteln, um daraus die Korrelation zwischen diesen Anteilswerten zu errechnen.

bei
+) weil Blutabstrichen mindestens 500 Zellkernen untersucht werden müssen, um eine sichere Geschlechtsdiagnose aufstellen zu können (vgl. Abschnitt 2.2.).

Bei 10 Frauen wurden ein zweites Mal 500 Zellkernen pro Merkmal ausgewertet, um mögliche persönliche Ungenauigkeiten beim Zählen zu testen.

Die Haarwurzel- und Mundschleimhautzellen wurden mit Karbolfuchsin nach den folgenden Methoden gefärbt.

H a a r w u r z e l z e l l e n

Ein frisch gezupftes Haar wurde 20 min. lang in einer Lösung destillierten Wassers und Essigsäure (3:1) liegen gelassen, bis die Zellen sich leicht auf dem Objektträger streichen ließen. Nach Lufttrocknen erfolgte die Färbung in Karbolfuchsin 10 min. lang. Nach einer ganz kurzen Differenzierung (10-15 sek.) in Äthyalkool 95%, wurden die Präparate zuerst in Xylol gestellt (mindestens 20 min.) und dann in Cedax eingebettet. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop in Ölimmersion untersucht.

M u n d s c h l e i m h a u t z e l l e n

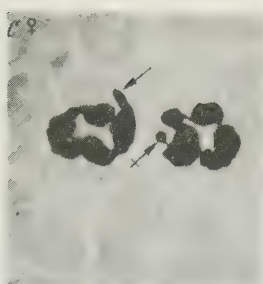
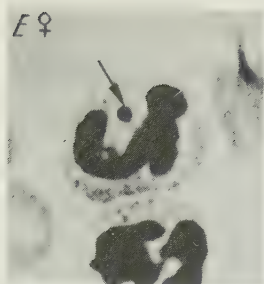
Mundschleimhaut wurde leicht mit einem Holzspatel von der Innenseite der Wangen abgeschabt und homogen auf dem Objektträger aufgetragen. Das Präparat wurde gleich danach in Äthylalkool 10 min. lang fixiert. Nach Spülung mit destilliertem Wasser und Lufttrocknen wurde es 20-25 min. in Karbolfuchsin gestellt. Die Differenzierung und die Einbettung erfolgten wie bei den Haarwurzelzellen. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop

in Ölimmersion untersucht.

G r a n u l o c y t e n

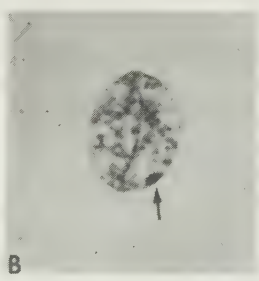
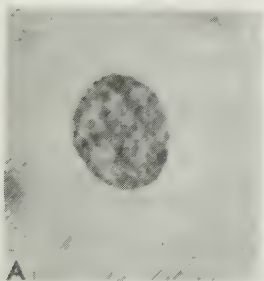
Ein Bluttröpfchen aus der Fingerspitze wurde auf einem Objektträger mit der Kante eines zweiten Objektträgers glattgestrichen. Die Fixierung durch Lufttrocknen dauerte 1-2 Tage. Die Färbung erfolgte nach der MAY-GRÜNWALD-Methode. Nach Gründlicher Spülung mit destilliertem Wasser und Lufttrocknen wurden die Präparate ebenfalls unter dem Mikroskop in Ölimmersion untersucht.

Bei jedem Präparat wurde bei 500 zellkernen die Anzahl an Chromatin-positiven Zellkernen notiert.



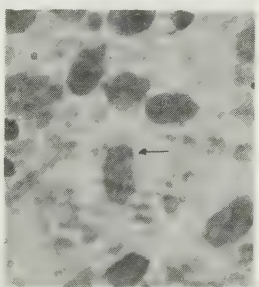
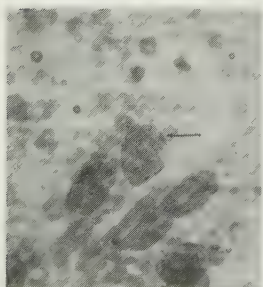
Leukocytennuclei mit drumsticks

Aus DAVIDSON, W.M. und SMITH, D.R.: In OVERZIER, C. (ed.):
Intersexualität - Academic Press, New York, 1963 (mit no-
dule sexile, rechts); 1961 (ohne nodule sexile, links)



Mundschleimhautnuclei mit Geschlechtschromatin

Aus MOORE, K.L. und BARR, M.L. (1955). Lancet, 2:57



Haarwurzelnuclei mit Geschlechtschromatin Eigene Aufnahmen

3.2. Statistische Auswahlkriterien der Testpersonen

Das im Abschnitt 2.1. erörterte Problem kann nur durch eine Teilerhebung angegangen werden, da die Gesamtheit der Frauen offensichtlich nicht zu erfassen ist. Ich versuche, diese Teilerhebung möglichst einer Stichprobe im statistischen Sinn anzunähern, um einigermaßen korrekte Schlüsse auf die Grundgesamtheit ziehen zu können. " Unter einer Stichprobe versteht man (nämlich) eine Teilmenge von Einheiten, die aus einer bestimmten Masse ausgewählt wurden, mit dem Ziele, daraus Schlüsse auf die Beschaffenheit dieser Masse zu ziehen. Die Masse selbst, die durch die Stichprobe untersucht werden soll, wird in der Stichprobentheorie als (Grund-) gesamtheit bezeichnet. Die Anzahl der ausgewählten Einheiten heißt Stichprobenumfang " (vgl. PFANZAGL, 1972). Der zufällige Fehler, der durch die Beschränkung auf einen Teil der Gesamtheit entsteht, ist berechenbar, wenn die Auswahl -im wesentlichen- durch den Zufall gesteuert wird.

Da mein näherer weiblicher Bekanntenkreis meines Dafürhaltens ohne jegliche Gestzmäßigkeit entstanden ist, also ziemlich zufällig, und außerdem Frauen unterschiedlichen Alters enthält, entschloß ich mich, ihn in die Stichprobe mit einzubeziehen. Es handelte sich um 39 Testpersonen, weitere 11 wählte ich willkürlich aus den Biologie-Studentinnen der Münchner Universität ⁺⁾ . Der Stich-

⁺⁾ Das Repräsentationskriterium der Stichprobe ist insofern nicht erfüllt, als in ihr nur ein verschwindend klei-

probenumfang beträgt also 50 Frauen -sie sind alle klinisch normal- und hat somit den Vorteil, das sämtliche theoretisch möglichen Anteilswerte dieser Stichprobe sich annähernd " normal verteilen " (vgl. CHRISTMANN, 1970a). Da die Normalverteilung tabelliert ist, erleichtert sie den Test wesentlich (vgl. Abschnitt 4.2.1.).

Fortsetzung der umseitigen Fußnote
ner Anteil an Frauen anderer Rassen enthalten sind.

4. Diskussion

4.1. Auswertungskontrolle

Bevor ich zur eigentlichen Diskussion übergehe, soll noch folgender Sachverhalt geklärt werden. Wie bereits angeführt, wurden aus 150 Objektträgern - das sind 3 Abstriche pro Testperson - jeweils 500 Zellen auf ihre Anzahl bzw. Anteil an Chromatin-haltigen Zellkernen hin untersucht und zwar getrennt nach den Abstrichen von Haarwurzeln, Mundschleimhaut und Blut (H,M,B). Dabei konzentrierte ich mich pro Objektträger jeweils auf wenige Stellen mit gut auswertbaren Zellkernen. Der Verdacht jedoch, daß in den Objektträgern die Zellen mit Geschlechtschromatin ungleichmäßig verteilt sein könnten und daß ich beim Auszählen persönlichen Ungenauigkeiten unterlag, ließ mich die Auswertung wiederholen. Ich beschränkte mich dabei auf die 30 Objektträger von 10 aus der Stichprobe zufällig ausgewählten Testpersonen und achtete nun darauf, daß sich die untersuchten Zellen über das ganze Präparat verteilen. Die beiden Auswertungen dieser 30 Objektträger sind als unabhängige Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheiten zu betrachten - ihre Elemente sind die examinierten Zellkerne - und müssen nun verglichen werden.

Die nachfolgende Tabelle gibt Auskunft über die Zahl von Chromatin-positiven Zellen der in beiden Stichproben jeweils 5000 ausgewerteten Zellkerne für Haarwurzeln (H), Mundschleimhaut (M) und Blut (B).

	H		M		B	
	m	o	m	o	m	o
1.St.	1624	3376	1213	3787	171	4829
2.St.	1667	3333	1255	3745	159	4841

m = mit Geschlechtschromatin o = ohne Geschlechtschr.

Die Frage ist nun, ob die Abweichungen, die bei Stich -
proben unvermeidlich sind, in diesem Fall noch dem Zu-
fall zugeschrieben werden können. Wenn ja, dann ist sta-
tistisch gesichert, daß die Zellen mit Geschlechtschro-
matin im Präparat gleichmäßig verteilt sind. Zudem kann
angenommen werden, daß ich keine Auswertungsfehler ge-
macht habe. Der Vergleich zweier empirischer (Stichpro-
ben-) Verteilungen geschieht mit dem sogenannten Chi-
Quadrat-Test. Dabei wird das Abweichungsmaß bzw. die
Testgröße durch folgenden Ausdruck beschrieben:

$$V = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \frac{(fo_{ji} - fe_{ji})^2}{fe_{ji}} ; \quad i=1....n, j=1...m$$

fo_{ji} bedeutet den beobachteten Wert in der i-ten Gruppe
j-ten Stichprobe (CHRISTMANN, 1970b) d.h. in meinem
Fall, die in den 6 Spalten und 2 Zeilen der folgenden

Kontingenztafel angeführten Werte, die die Anzahl von Chromatin-positiven und Chromatin- negativen Nuclei der pro Merkmal und Stichprobe 5000 untersuchten Zellen angeben.

KONTINGENZTAFEL

(6 Gruppen, 2 Stichproben)

Gruppen (i) (j) Stich- proben	1	2	3	4	5	6	>
	H		M			B	
	m	o	m	o	m	o	
1	1624	3376	1213	3787	171	4829	15000
2	1667	3333	1255	3745	159	4841	15000
Σ	3291	6709	2468	7532	330	9670	30000

f_{oji} bedeutet den für f_{oji} entsprechenden theoretisch erwarteten Wert. Er wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$f_{oji} = \frac{\sum_{j=1}^m f_{oji}}{\sum_{j=1}^m n_j} \cdot n_j \quad (\text{CHRISTMANN, 1970b})$$

$$\text{z.B. } fe_{11} = \frac{1624 + 1667}{30000} \cdot 15000 = 1645,5.$$

n_j ist der Umfang der j -ten Stichprobe und beträgt für die erste Stichprobe 15000, für die zweite Stichprobe 15000 und für beide Stichproben zusammen 30000 Zellen. Man kann mathematisch nachweisen, daß sich die Verteilung der Prüfgröße unter folgenden Voraussetzungen der Chi-Quadrat-Verteilung annähert:

- (1) die Stichproben müssen unabhängig sein
- (2) fe_{ji} muß für alle j und i größer oder mindestens gleich fünf sein.

Alle Annahmen treffen hier zu.

Die Chi-Quadrat-Verteilung ist tabelliert und gibt in Abhängigkeit von den sogenannten Freiheitsgraden - Produkt aus (Anzahl der Gruppen-1) und (Anzahl der Stichproben-1) oder kürzer ($S-1$) ($Z-1$) - die Wahrscheinlichkeit an, mit der ihre Dichtefunktion Werte annehmen kann, die kleiner oder gleich einem vorgeschriebenen Wert C sind. (CHRISTMANN 1970c).

Man kann jetzt in Anlehnung an die obige Fragestellung, ob Abweichungen zwischen den beiden Stichproben dem Zufall zugeschrieben, sagen, nur dann, wenn der aus der Prüfgröße ermittelte Wert kleiner als der kritische Wert C ist und die Wahrscheinlichkeit, irgendeinen Wert zu erhalten, der kleiner/gleich C ist, 0,95 beträgt. Das heißt, wenn man einen Wert größer als erhält und somit die auf-

gestellte Hypothese verwirft,⁺⁾ lehnt man nur in 5 Prozent aller möglichen Fälle die Hypothese ab, obwohl sie richtig ist. 5% oder allgemein ausgedrückt α ist also die Irrtumswahrscheinlichkeit oder das sogenannte Signifikanzniveau.

Für die Berechnung von V, der Prüfgröße, lieferte der Computer folgende Werte:

fo	fe	fo-fe	(fo-fe) ² :fe
1624	1645,5	21,5	0,2809
1667	1645,5	21,5	0,2809
3376	3354,5	21,5	0,1378
3333	3354,5	21,5	0,1378
1213	1234	21	0,3574
1255	1234	21	0,3574
3787	3766	21	0,1171
3745	3766	21	0,1171
171	165	6	0,2182
159	165	6	0,2182
4829	4835	6	0,0075
4841	4835	6	0,0075

$$V = \sum_{i=1}^6 \frac{2}{\sum_{j=1}^4 \frac{(f_{o_{ji}} - f_{e_{ji}})^2}{f_{e_{ji}}}} = 2,3376 \quad \underline{\underline{2,3376 \quad \Sigma}}$$

⁺⁾ nämlich, daß Abweichungen zwischen den Werten der beiden Stichproben dem Zufall zuzuschreiben sind.

Der kritische Wert C bei 2 Freiheitsgraden und $\alpha = 0,05$ beträgt ungefähr 6,0 (obwohl man es hier mit 6 Gruppen und 2 Stichproben zu tun hat, ist die Anzahl der Freiheitsgrade nicht $(6-1)(2-1)$, sondern $(3-1)(2-1)$, weil man, wenn die Besetzungszahl der 1. Gruppe bestimmt ist, sofort die Besetzungszahl der 2. Gruppe kennt, da sich die untersuchten Haarwurzelzellen auf 5000 ergänzen müssen. Analog für Mundschleimhaut und Blut).

In meinem Fall ist der Wert der Prüfgröße kleiner als der kritische Wert, die Hypothese, daß die Stichprobenunterschiede dem Zufall angelastet werden können, also nicht signifikant sind, wird angenommen.

Dieses Ergebnis, um es noch einmal zu sagen, bestätigt, daß die Chromatin-positiven Zellkerne auf dem Objektträger ungefähr gleichmäßig verteilt sind und daß ich keine signifikanten Fehler bei der begangen habe.

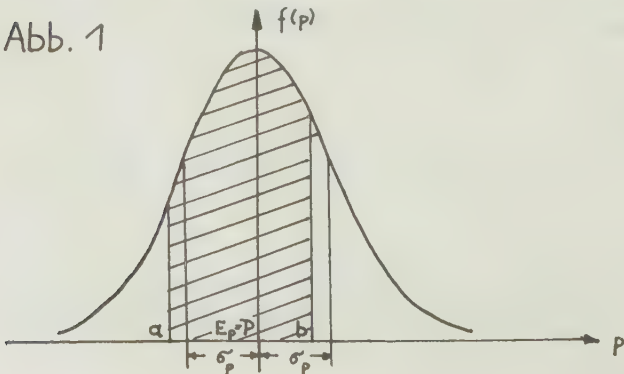
Von besonderer Bedeutung ist nun 1. die Frage nach dem Anteil an Chromatin-positiven Nuclei bei den Zellen der Haarwurzeln, der Mundschleimhaut und des Blutes und 2. die Untersuchung, wie stark die Anteilswerte der 50 Testpersonen korrelieren (vgl. Arbeitshypothese).

4.2. Vorläufige Untersuchungsergebnisse und Vergleich mit einschlägigen Arbeiten

4.2.1. Schluß von den Stichprobenanteilswerten auf die Grundgesamtheit

Zur ersten der vorseitigen Fragen muß erläutert werden, daß es sich bei der Bestimmung von Anteilswerten um eine homografe Aufgabenstellung handelt. Der mathematische Erwartungswert für den relativen Anteil p von Elementen in einer Stichprobe mit einer bestimmten Merkmalsausprägung - in meinem Fall Zellkerne mit Geschlechtschromatin - ist gleich dem relativen Anteil P in der Grundgesamtheit, den man aber in diesem Fall nicht kennt. Es liegt nun nahe, anzunehmen, daß die Diskrepanz zwischen p und P nicht groß ist und daß p als desto besserer Schätzwert für P betrachtet werden kann, je größer der Umfang n der Teilerhebung (Stichprobe) ist. Es besteht aber keine praktische Möglichkeit, die Richtigkeit dieser Annahme zu überprüfen. Man kann jedoch mathematisch nachweisen, daß sich für $n \rightarrow \infty$ bzw. $n \geq 50$ alle denkbar möglichen Anteilswerte der Stichprobe um das wahre P annähernd normal verteilen

Abb. 1



und daß die Wahrscheinlichkeit, daß p in das Intervall $[a, b]$ fällt, gleich der schraffierten Fläche ist, also dem bestimmten Integral $\int_a^b f(p) dp$. Wegen der Beschränkung auf eine Teilerhebung lassen sich keine hundertprozentigen Aussagen machen.

Das Integral der Normalverteilung läßt sich zwar nicht elementar auswerten, kann aber durch das Integral der standardisierten Normalverteilung mit dem Mittelwert 0 und der Varianz 1 ersetzt werden, so daß für $n \rightarrow \infty$ bzw. $n \geq 50$ gilt:

$$\text{Wkt} \left[a \leq \frac{p-P}{\sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}} \leq b \right] \approx \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_a^b e^{-\frac{z^2}{2}} dz$$

(KREYSZIG, 1968a)

Zur Erklärung der Symbole: n bedeutet den Stichprobenumfang, p ist der Anteilswert von Elementen mit bestimmter Merkmalsausprägung in der Stichprobe und P beschreiben den entsprechenden Anteilswert der Grundgesamtheit.

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_a^b e^{-\frac{z^2}{2}} dz \text{ ist die Verteilungsfunktion ei-}$$

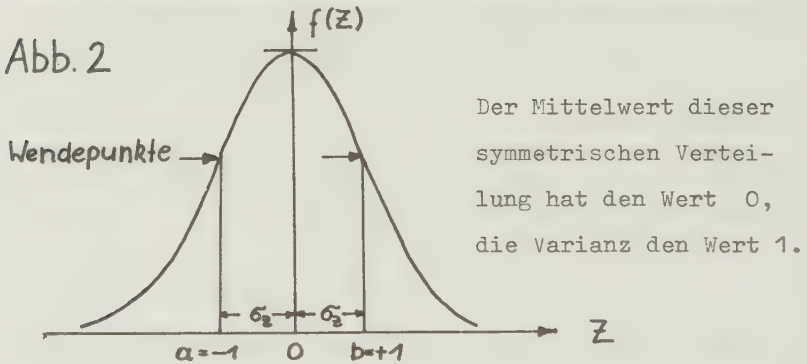
ner standardisierten Normalverteilung nach GAUSS. z ist dabei die Zufallsvariable und hat die Form

$$\frac{p-P}{\sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}} .$$

a und b sind die Grenzen des Integrals und bezeichnen den Bereich, in dem das z mit einer bestimmten Wahrschein-

lichkeit liegt.

$\frac{P(1-P)}{n}$ steht für die Varianz σ_p^2 ⁺⁾ aller theoretisch möglichen Anteilswerte, die eine Stichprobe vom Umfang n annehmen kann. Mit wachsendem n wird die Varianz kleiner, das heißt anschaulich, je größer die Stichprobe ist, desto weniger wird p von P abweichen. Die standardisierte Gauß'sche Normalverteilung hat folgendes Aussehen:



Die Fläche unter dieser Kurve von $a = -\infty$ bis $b = +\infty$ beträgt 1. Diesen Wert kann man einer Tabelle entnehmen, ebenso wie die entsprechenden Werte für beliebige Grenzen a und b .

In diesen Eigenschaften liegt die Bedeutung der standardisierten Normalverteilung für Wahrscheinlichkeitsaussagen. Die Wahrscheinlichkeit also, daß bei einer Stichprobe vom Umfang n die Variable Z Werte zwischen a und b annimmt, ist ungefähr gleich dem Wert des be-

+)

Die Varianz ist die Summe der Abweichungsquadrate aller Meßwerte einer Verteilung von ihrem arithmetischen Mittel, dividiert durch die um 1 verminderte Anzahl der Messungen.

stimmten Integrals $\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_a^b e^{-\frac{z^2}{2}} dz$. Durch Umformulierung des Ausdruckes Wkt $\left[a \leq \frac{p-P}{\sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}} \leq b \right]$ erhält

man die Wahrscheinlichkeit, mit der bei bekanntem P das

p der Stichprobe im Intervall $\left[P+a \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} ; P+b \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} \right]$

liegt (Schluß von der Grundgesamtheit auf die Stichprobe). Oder man erhält die Aussage, wiederum durch entsprechende Umformulierung, mit welcher Sicherheit das w

wahre aber jetzt unbekannte P im Intervall $\left[p-b \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} ; p-a \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} \right]$ liegt. Hier muß von Sicherheit gesprochen

werden, da P bereits einen ganz bestimmten Wert hat und ihn deshalb nicht mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit annehmen kann. In diesem Fall handelt es sich um einen

Schluß von der Stichprobe auf die Grundgesamtheit, wie er in dieser Arbeit vollzogen werden soll. Da aber P und somit $\frac{P(1-P)}{n}$, die Varianz aller möglichen Anteilswerte, unbekannt ist, kann die Varianz durch $\frac{p(1-p)}{n}$ ersetzt werden (CHRISTMANN, 1970d).

Für $a = -1,96$ und $b = +1,96$ kann man aus der Tabelle den Wert 0,95 entnehmen und man erhält als Schluß auf die Grundgesamtheit folgende Wahrscheinlichkeitsaussage:

Wkt $\left[p-1,96 \sigma_p \leq P \leq p+1,96 \sigma_p \right] = 0,95$

d.h. wenn eine Stichprobe einen bestimmten Anteilswert p aufweist und das σ_p bekannt ist, dann liegt der wahre aber unbekannte Anteilswert P der Grundgesamtheit im In-

+) Hier sei vermerkt, daß a nur negative Werte annehmen kann, da es links vom Mittelwert 0 liegt (vgl. Abb. 2)

tervall $\left[p - 1,96 \sigma_p; p + 1,96 \sigma_p \right]$ bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$. In die Varianz $\sigma_p^2 = \frac{P(1-P)}{n}$ geht aber die unbekannte Größe $P(1-P)$ ein; sie wird ersetzt durch $p(1-p)$ (vgl. oben). Für Haarwurzeln, Mundschleimhaut und Blut ergeben sich folgende Werte:

	p	p(1-p)	$\frac{p(1-p)}{n}$	$\sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$	$1,96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$
H	0,2675	0,1957	0,000391	0,0196	0,038416
M	0,2113	0,1667	0,000333	0,0182	0,035750
B	0,0295	0,0286	0,000057	0,0076	0,014840

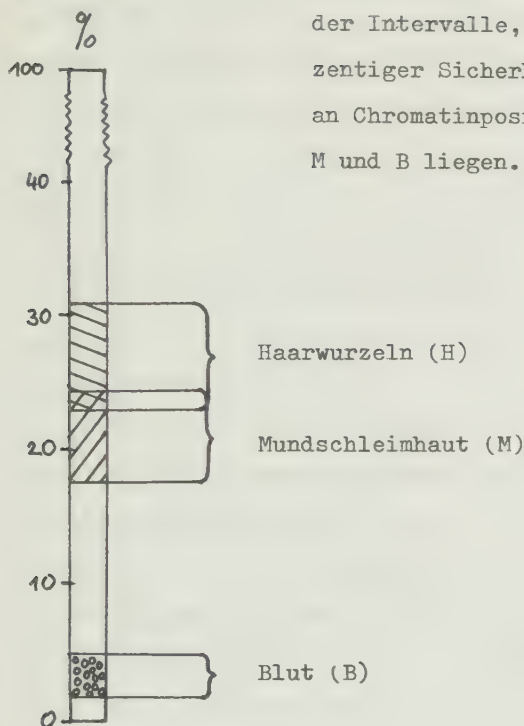
Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($\alpha = 0,05$) läßt sich somit sagen, daß bei den Haarwurzeln der Anteilswert an Geschlechtschromatinpositiven Zellen zwischen 22,91 % und 30,59 % liegt.

Für Mundschleimhaut gilt bei gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit das Intervall 17,56 % bis 24,71 %.

Und zum Blut gehört das Intervall 1,47 % bis 4,43 %.

Eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse findet sich auf der nächsten Seite.

Abb. 3



Mit Hilfe der tabellierten Normalverteilung habe ich also die Grenzen der drei Intervalle festsetzen können, in denen sich die Anteilswerte der Grundgesamtheit an Chromatin-positiven Nuclei für Haarwurzeln, Mundschleimhaut und Blut mit einer Sicherheit von 95 % oder einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % befinden. Die Intervalle von Haarwurzeln und Mundschleimhaut haben einen kleinen Teil gemeinsam, was zwei Möglichkeiten offen läßt. Die Anteilswerte der Grundgesamtheit an Chromatin-positiven Nuclei von Haarwurzeln und Mundschleimhaut könnten ohne

weiteres beide in dem gemeinsamen Teil liegen und sogar koinzidieren (das würde heißen, daß die Gesamtheit aller Frauen durchschnittlich den gleichen Anteilswert an Chromatin-positiven Nuclei für Haarwurzeln und Mund - schleimhaut besitzt) oder, daß die beiden Anteilswerte der Grundgesamtheit in den nicht gemeinsamen Teilen der Intervalle liegen (das würde heißen, daß die Gesamtheit aller Frauen zwei unterschiedliche Anteilswerte an Chromatin-positiven Nuclei für Haarwurzeln und Mund - schleimhaut besitzt, was später auch noch nachgewiesen wird (vgl. 4.3.2.)). Beim Blut liegt der Anteilswert an drumstick-positiven Nuclei in einem ganz anderen und niedrigeren Intervall als bei den beiden oben genannten Merkmalen. Das heißt, daß die Gesamtheit aller Frauen im Durchschnitt einen Prozentsatz an drumstick-positiven Nuclei besitzt, der höchst unwahrscheinlich gleich denen von Haarwurzeln und Mundschleimhaut ist.

4.2.2. Vergleich mit einschlägigen Arbeiten

Nun sollten die Ergebnisse anderer Untersuchungen zum Vergleich herangezogen werden. KALLAPRAVIT (1970) veröffentlichte in Bangkok " Sexchromatin study in the hair root ", worin er zum Ergebnis kam, daß 54,30 % der Haarwurzelszellkerne Chromatin-haltig sind. Da es mir unmöglich war, diese Veröffentlichung zu erhalten, konnte ich das Resultat nur einer Zusammenfassung ⁺⁾ dieser Arbeit entnehmen, die aber keine näheren Angaben über die Untersuchungsmethoden enthielt. Die einzige Auskunft war, daß die Haarwurzeln von 10 klinisch normalen Frauen ausgewertet wurden. Zur Gegenüberstellung sei noch einmal mein Ergebnis angeführt: $26,75 \pm 3,84 \%$ ($\alpha = 0,05$). Bei einer entsprechenden Untersuchung von Mundschleimhaut bei 25 Frauen und jeweils 30 Mundschleimhautnuclei ermittelte CURTIS (1969) einen Anteilswert von $40,8 \pm 2,5 \%$ ($\alpha = 0,05$) gegenüber $21,13 \pm 3,58 \%$ ($\alpha = 0,05$) bei 50 Frauen und jeweils 500 Mundschleimhautnuclei in dieser Arbeit. Mrs. CURTIS wandte auch eine andere Methode der Färbung und Fixierung von Zellen an. Sie färbte mit Kresyl-violett und fixierte mit einer 1:1 Lösung von Äther und 100-prozentigem Äthylalkohol für eine Dauer von 15 Minuten bis zu drei Tagen.

Ein anderes Ergebnis ermittelte DANEMAN (1970). Eine Zusammenfassung ⁺⁾ seiner Arbeit " A survey of the inci -

⁺⁾ Die Zusammenfassungen, einschließlich der nächsten, wurden der Zeitschrift " Excerpta Medica-Human Genetics" entnommen.

dence of sexchromatin in a group of South African university students " berichtet, daß er bei 40 Studentinnen einen Anteilswert von ungefähr 35 % Chromatin-haltiger Zellkerne in der Mundschleimhaut erhalten habe. Leider wurde auch hier auf weitere Angaben verzichtet.

Nähere Ausführungen fehlen auch in der Zusammenfassung der Arbeit von TSUANG M.T. und TSUANG H.S. (1972), in der die Mundschleimhautzellen von 2182 chinesischen Schulmädchen im Alter von 7 bis 13 Jahren untersucht wurden. Hier wurde ein durchschnittlicher Anteilswert an Chromatin-positiven Mundschleimhautnuclei von $18,20 \pm 6,32$ % ermittelt, was ungefähr meinem Ergebnis entspricht. Die Autoren fanden den Prozentsatz niedrig und brachten als erklärende Gründe unter anderem die mögliche Existenz von Einflußfaktoren ethnischer und geographischer Natur. Für die relative Häufigkeit von drumsticks in Blutausstrichen erhielt KÖBBERLING (1966) einen Wert von 2,6 % gegenüber meinem von $2,95 \pm 1,48$ % ($\alpha = 0,05$). Er wertete je 1000 Nuclei bei sechs Frauen aus.

Offensichtlich stimmen bei einem Signifikanzniveau von

$\alpha = 0,05$ mit den Ergebnissen dieser Arbeit nur die Resultate von TSUANG und KÖBBERLING überein. Für die Abweichungen der anderen Ergebnisse können folgende Gründe angeführt werden: i. die Möglichkeit verschiedenartiger Untersuchungsmethoden, wie sie mit Sicherheit im Fall CURTIS gegeben sind.

ii. Der enorme Unterschied zwischen meinem " Haarwurzel-ergebnis " und dem aus Bangkok verleitet zur Vermutung

von rasseverbundenen Einflußfaktoren. Bei meinen Test -
personen habe ich bemerkt, daß schwarzes kräftiges Haar
dicke Haarwurzeln besitzt, die sich leicht auf dem Ob-
jektträger abstreichen lassen und bessere Präparate mit
gut auswertbaren Zellkernen liefern, während helles Haar
kleine Haarwurzeln aufweist, die oft nicht genügende gut
auswertbare Zellkerne haben. Die Untersuchung der im all-
gemeinen schwarzhaarigen Thailänderinnen könnte also von
vornherein ein anderes Ergebnis liefern.

iii. Diesen Punkt beschreibt ein statistischer Zusammen-
hang. Da ich bei 50 Frauen jeweils 500 Haarwurzel-,
Mundschleimhaut und Blutzellen untersuchte, erhielt ich
drei mal 50 Anteilswerte, die innerhalb der Gruppen
Haarwurzeln und Mundschleimhaut besonders stark schwank-
ten. Für Haarwurzeln liegt bei einer Standardabweichung ⁺
von 32,50 chromatinhaltiger Zellkerne der Schwankungs-
bereich der relativen Häufigkeiten zwischen 10 % und 41
Die entsprechenden Zahlen für Mundschleimhaut sind $s =$
29,60 Zellkerne, die Grenzen des Schwankungsbereiches
6 % und 40,2 % ⁺⁺). Die Abweichungen der anderen Ergeb-
nisse von den meinen und ihre Differenzen untereinander
könnten nun darauf zurückzuführen sein, daß zufälli

⁺) Die Standardabweichung s ist die Wurzel der Varianz
(vgl. Fußnote S. 44).

⁺⁺) Für Blut gilt $s=7,69$ Zellkerne; Schwankungsbereich
0,8 % bis 7 %.

in der Mehrzahl solche Testpersonen in die Stichprobe gelangten - was aufgrund der großen Schwankungsbereiche durchaus vorstellbar ist - , die jedesmal zu anderen und unter Umständen vom tatsächlichen aber unbekannten Wert stark abweichenden Ergebnissen führten. Das könnte in verstärktem Maße für die der angeführten Autoren - etwa DANEMAN und CURTIS - zutreffen, die weniger Frauen und wahrscheinlich auch weniger Zellkerne - bei CURTIS ist dies sicher - untersuchten.

iiii. Was die Geschlechtschromatinhäufigkeit der Mund - schleimhautzellen betrifft, meint zudem ZAKHAROV (1972), daß individuelle Schwankungen auf die Rate der physiologischen Regenerierung der Epithelschicht in der Zeit der Schleimhautentnahme zurückzuführen seien. Eine intensive Regenerierung führe zu einer niedrigen Geschlechtschromatinhäufigkeit, weil sich das X-Chromatin in der amitotischen Zellteilung nicht spalte sondern in einer der Tochterzellen zurückbleibe. Deshalb vermindere sich die relative Häufigkeit der Chromatin-positiven Nuclei mit der Zunahme der Zellteilungen.

Vorausgesetzt, daß ZAKHAROV's Annahme zutrifft, müßten sich die Epithelzellen der meisten von mir untersuchten Testpersonen in einer Phase intensiver Regenerierung befinden, was aber meiner Ansicht nach bei immerhin 50 Frauen recht unwahrscheinlich ist und sich somit kaum als Erklärung für die Abweichung meines " Mundschleim - hautergebnisses " von anderen Untersuchungsergebnissen eignen dürfte. Solange jedoch die starken Schwankungen

der relativen Häufigkeiten nicht eindeutig erklärt werden können, d.h., solange sie - wie in dieser Arbeit - mehr oder weniger als vom Zufall abhängig betrachtet werden und nicht berücksichtigt wird, daß vielleicht bestimmte Einflußfaktoren wie die Rasse, die Umwelt und/oder das Alter etc. dafür verantwortlich gemacht werden können, bleiben die obigen Annahmen ziemlich spekulativ und vage.

4.3. Die Überprüfung der Arbeitshypothese

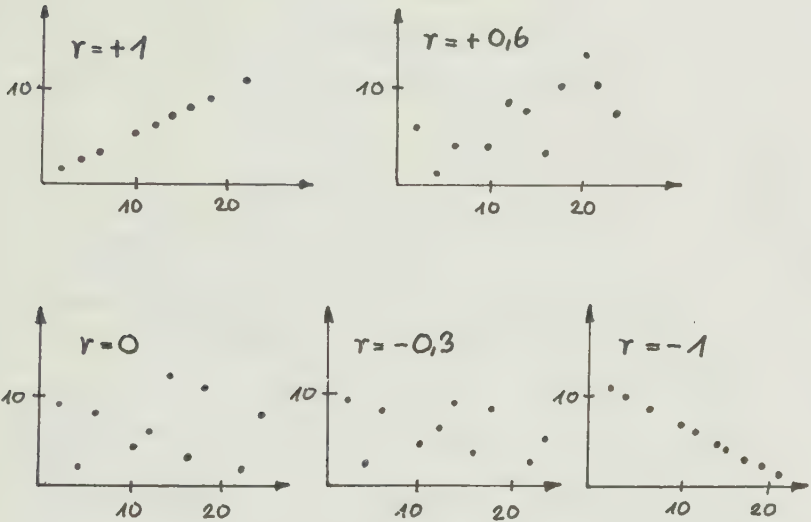
4.3.1. Die Korrelation der Anteilswerte an Chromatin-positiven Nuclei zwischen den untersuchten Geweben

Die Formulierung der Arbeitshypothese (vgl. 2.1.) und deren Überprüfung macht die Problematik der Korrelationsanalyse deutlich: an mehreren Elementen - hier 50 Frauen - werden Reihen von Beobachtungen vorgenommen - hier die Anteilswerte Chromatin-positiver Nuclei von Haarwurzeln, Mundschleimhaut und Blut einer jeden Frau -, um sie dann miteinander zu vergleichen und im Hinblick auf eventuell bestehende Zusammenhänge zu untersuchen. Die Frage nach der Enge dieser Zusammenhänge charakterisiert das Korrelationsproblem und findet ihre Antwort im Wert des Korrelationskoeffizienten.

Handelt es sich um die Reihe von nur zwei Beobachtungen, liegen also Wertepaare vor, so ist es vorteilhaft, die Werte so in ein kartesisches Koordinatensystem abzutragen, daß jedes Element durch einen Punkt widergegeben wird, um somit eine Punktwolke zu erhalten. Aus der Form einer solchen Punktwolke können bereits Schlüsse auf die Art der Beziehung zwischen den beobachteten Werten gezogen werden. (Zu diesen Ausführungen vgl. CHRISTMANN, 1970e). Auf der folgenden Seite werden mögliche Punktwolken graphisch dargestellt.

Graphische Darstellung möglicher Punktwolken:

Abb. 4



Im Verlauf dieser Darstellung kann man einen Wandel von stärkster positiver Korrelation (hohe/niedrige Werteder einen Reihe korrespondieren zu hohen/niedrigen Werten der anderen Reihe) über einen Nullzusammenhang bis hin zu stärkster negativer Korrelation (hohe/niedrige Werte gehören zu niedrigen/hohen Werten) feststellen.

Der Korrelationskoeffizient r nach BRAVAIS-PEARSON verleiht den einzelnen Korrelationsdiagrammen folgende Werte (von links oben nach rechts unten):

$+1$; $+0,6$; 0 ; $-0,3$; -1 (Quelle: KREYSZIG, 1968b).

r schwankt also zwischen -1 und $+1$.

Die Begründung ist hierfür recht einleuchtend, wenn man sich die anschauliche Ableitung des Koeffizienten nach

BRAVAIS-PEARSON vor Augen hält. Der Gedankengang ist folgender: aus dem Korrelationsdiagramm werden mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate ⁺⁾ zwei Regressionsgeraden ermittelt, derart, daß einmal die eine Variable (z.B. die Anteilswerte bei Mundschleimhaut) und das nächste Mal die andere Variable (z.B. die Anteilswerte bei Haarwurzeln) als unabhängige Variable angesehen wird.

Abb. 5

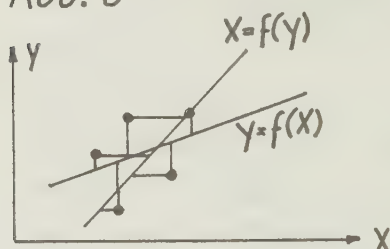
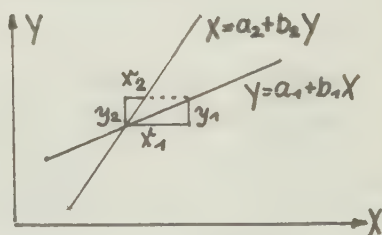
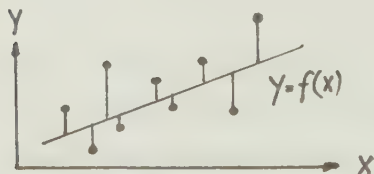


Abb. 6



Je kleiner der Winkel zwischen beiden Regressionsgeraden ist, umso geringer werden die Streuungen der Beobachtungen um die Regressionsgeraden d.h. desto enger wird der

⁺⁾



durch eine Punktwolke muß eine Gerade so gelegt werden, daß die Summe der quadratischen (eingezeichneten) Abstände der Punkte zur Geraden minimiert

wird. Man erhält dadurch die Regressionsgerade nach der Methode der kleinsten Quadrate. Die abhängige Variable ist hier Y d.h., die Regressionsgerade ist der Graph einer linearen Funktion von X: $Y=f(X)$ (vgl. CHRISTMANN, 1970f).

Zusammenhang. Der Winkel wird aber von den Steigungsmaßen b_1 und b_2 bestimmt und man benutzt als Maß für die Enge des Zusammenhangs das geometrische Mittel aus beiden Steigungsmaßen:

$$r = \sqrt{b_1 b_2} \quad (\text{vgl. CHRISTMANN, 1970g}).$$

$$b_1 \text{ ist aber } = \frac{y_1}{x_1} \quad \text{und} \quad b_2 = \frac{x_2}{y_2}. \quad \text{Daraus folgt, wenn die}$$

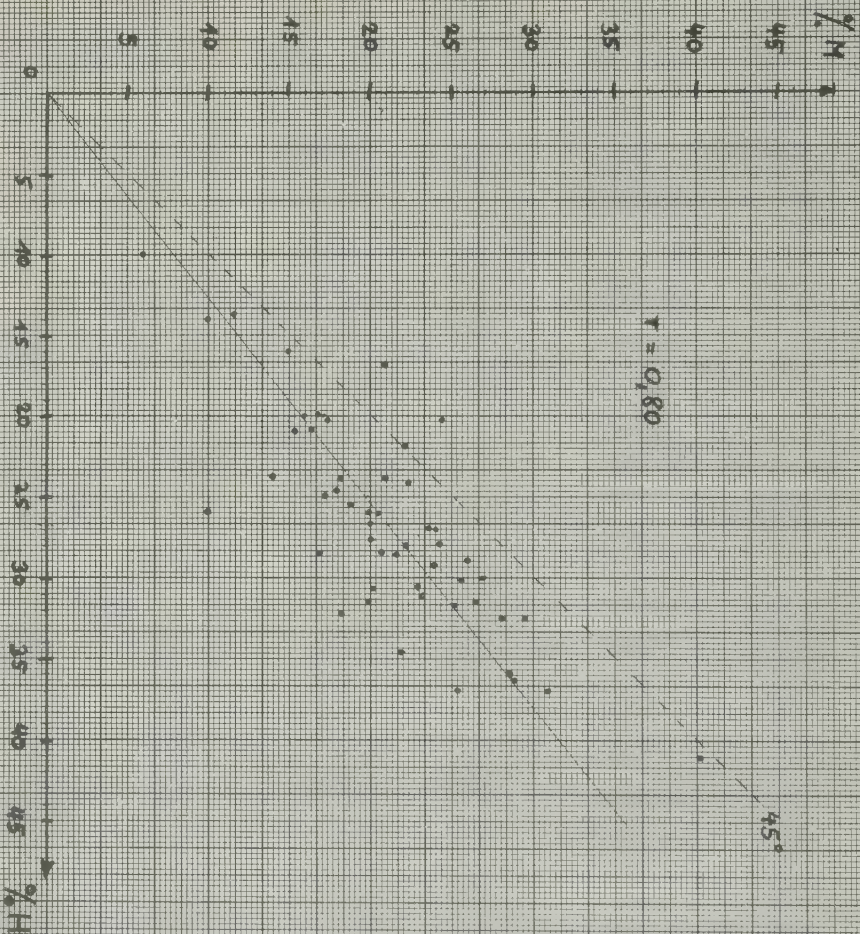
Punktwolke auf einer Geraden liegt, daß x_1 gleich x_2 ist und y_1 gleich y_2 und daß $r = \sqrt{b_1 b_2}$ somit die Werte -1 oder $+1$ annimmt, je nachdem ob die Regressionsgeraden negativ oder positiv geneigt sind. Weil, wie man aus der Abb. 6 entnehmen kann, x_2 nicht größer als x_1 wird, nimmt r also Werte zwischen -1 und $+1$ an. Ein negatives/positives Vorzeichen bedeutet negative/positive Korrelation.

Für die praktische Berechnung des BRAVAIS-PEARSON Koeffizienten lassen sich Formeln verwenden, die für die Bestimmung der Zusammenhänge zwischen den Anteilswerten an Chromatin-positiven Nuclei von Haarwurzeln und Mund - schleimhaut, Haarwurzeln und Blut sowie Mundschleimhaut und Blut dieser Arbeit folgende Computerwerte liefern:

r	M	B
H	0,80	0,37
B	0,36	--

Eine anschauliche Darstellung der Korrelationen bieten folgende Abbildungen.

Abb. 7



Korrelationsdiagramm
für die Anteilswerte an
X-chromatin-positiven
Nuclei von Haarwurzel-
und Mundschleimhaut-
zellen der 50 untersuch-
ten Frauen.

Abb. 8

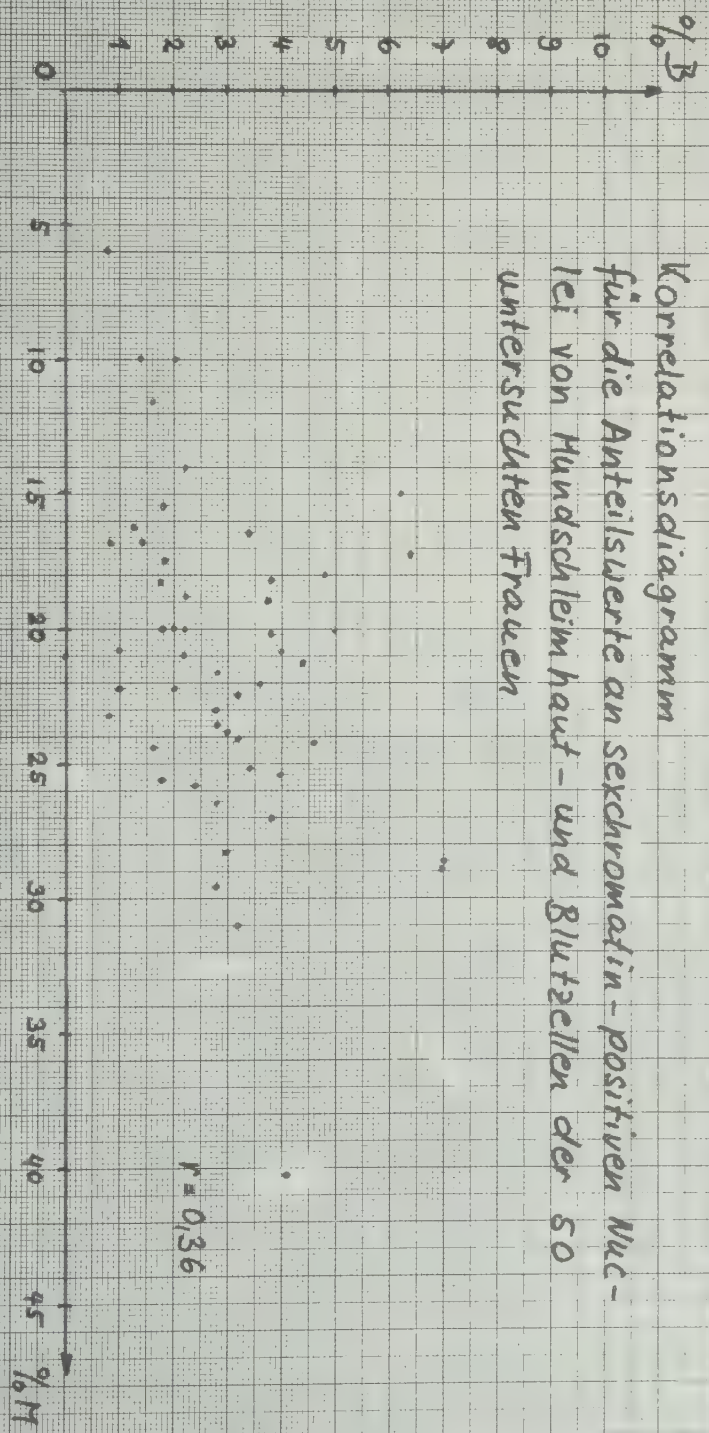
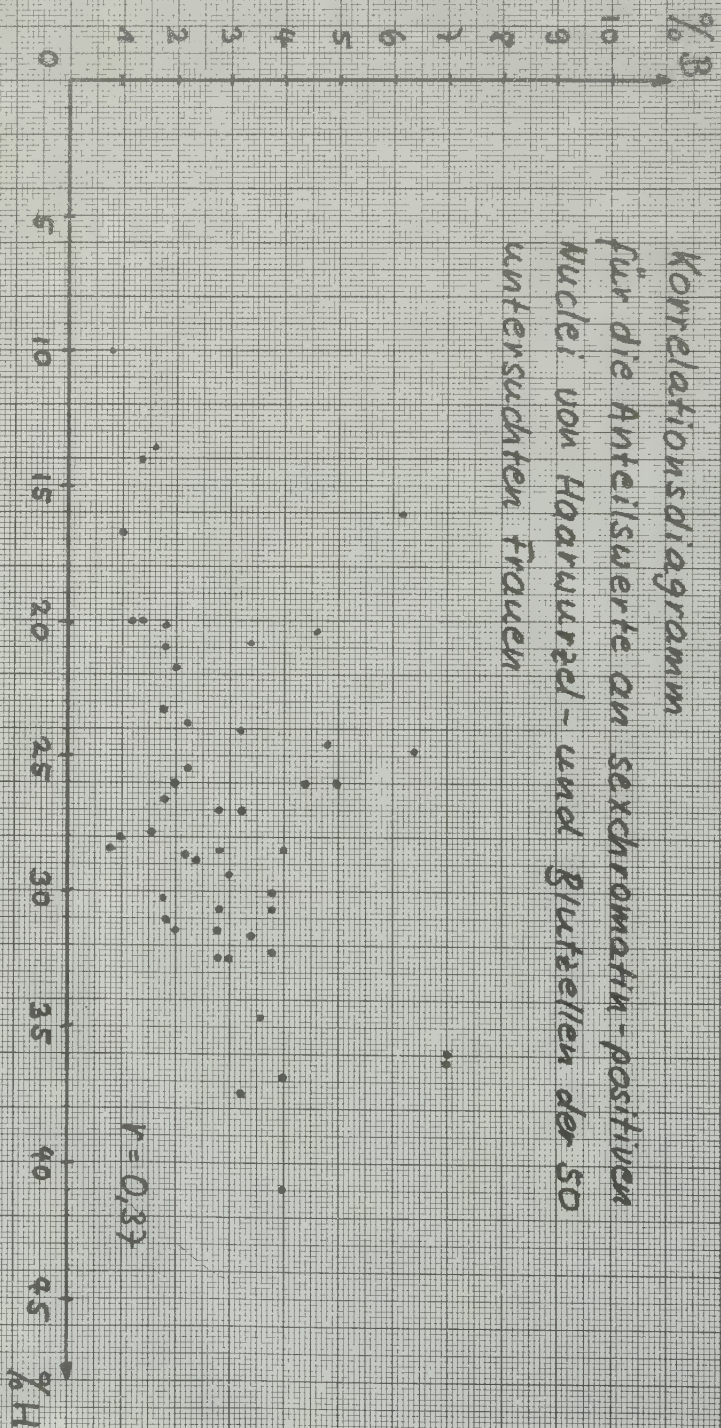


Abb 9



Dem Ergebnis nach ist also ein ziemlich hoher Korrelationskoeffizient zwischen den Anteilswerten bei Mundschleimhaut und Haarwurzeln festzustellen. Meine Arbeitshypothese wird dadurch zum Teil bestätigt. Zu einem ganz anderen Ergebnis gelangt man beim Vergleich der relativen Häufigkeiten bei Blut und Haarwurzeln sowie Mundschleimhaut. In beiden Fällen bekommt man annähernd gleiche aber ziemlich nahe bei Null liegende Korrelationskoeffizienten. In diesem Zusammenhang möchte ich auf die beiden fast gleichen Korrelationsdiagramme der Abbildungen 8 und 9 hinweisen. Gründe für die niedrige Korrelation können sein, daß, wie von KÖBBERLING (1966) angedeutet (vgl. 1.5.), die Anzahl der Zellen mit drumsticks in einem Blutabstrich stark von physikalischen Faktoren, z.B. dem Viscositätsverhältnis zwischen Kern und Plasma abhängt und daß solche Faktoren nicht die gleiche Rolle bei den Mundschleimhaut- und Haarwurzelzellen zu spielen scheinen. KÖBBERLING selber stellte fest, daß Schwankungen der Drumstickshäufigkeit nicht mit Schwankungen in der Häufigkeit des X-Chromatins anderer Gewebe übereinstimmen.

Es ist noch hinzuzufügen, daß nicht eindeutig festgestellt worden ist, ob der drumstick in den Leukozyten das Äquivalent des Geschlechtschromatins ist (HAMERTON, 1971). Die sehr niedrige beobachtete Korrelation zwischen Blut und Haarwurzeln sowie Mundschleimhaut stützt die These, wonach der drumstick ein Geschlechtsmerkmal des Zellkernes aber kein X-Chromatin darstellt.

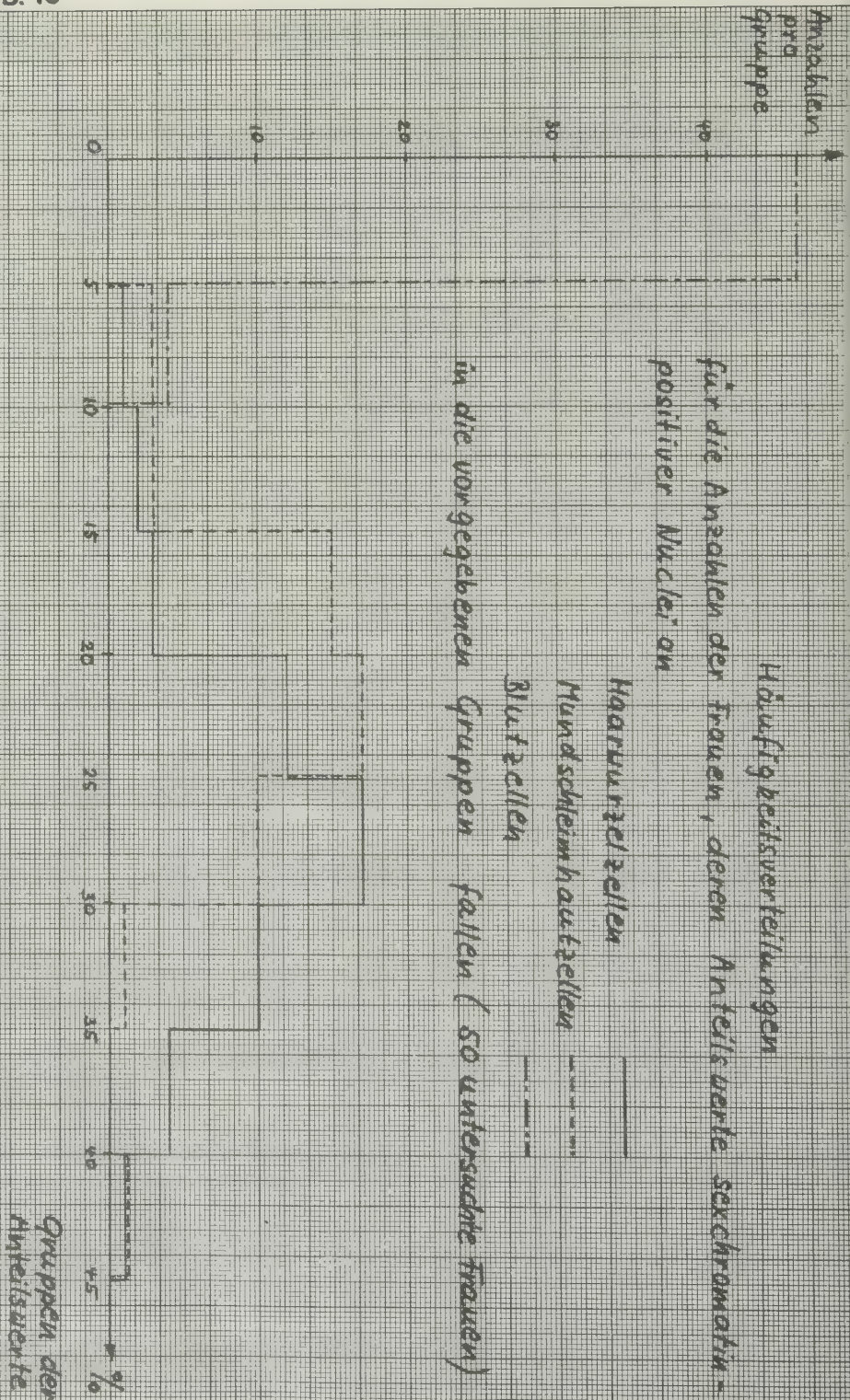
In die gleiche Richtung deutet die Feststellung, daß sich die Häufigkeitsverteilungen chromainhaltiger Nuclei bei Mundschleimhaut und Haarwurzeln von der Häufigkeitsverteilung der drumstick-positiven Nuclei bei Blut in Aussehen und Streuungsgrenzen wesentlich unterscheiden. Wie Abb. 10 zeigt, weisen die Häufigkeitsverteilungen der in der Untersuchung gewonnenen Anteilswerte bei Haarwurzeln und Mundschleimhaut gewisse Ähnlichkeiten auf. Sie liegen beide im selben Schwankungsbereich von 5 % bis 45%, verlaufen ziemlich parallel und scheinen nur verschoben zu sein (daher die unterschiedlichen Mittelwerte $\bar{x}$, vgl. Tabelle 3 im Anhang). Außerdem besitzen sie in der Größenordnung fast gleiche Variabilitätskoeffizienten ⁺⁾ , nämlich 24,30 bei Haarwurzeln und 28,01 bei Mundschleimhaut. Die entsprechenden Häufigkeitsverteilungen drumstick-haltiger Zellkerne bei Blut unterscheidet sich dagegen von den beiden anderen in den angeführten Punkten: der Schwankungsbereich von 0 % bis 10 % hat wesentlich niedrigere Grenzen, das Aussehen ist völlig anders und der Variabilitätskoeffizient $v = 52,09$ ist doppelt so groß. Man könnte nun annehmen, daß es sich beim Blut um die Häufigkeitsverteilung eines Merkmals handelt, das nicht mit dem Merkmal der Häufigkeitsverteilung bei Munc

⁺⁾

Der Variabilitätskoeffizient v ist gleich $\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$, wobei s = Standardabweichung und $\bar{x}$ = arithmetisches Mittel, und dient dem Vergleich der Streuungswerte von Verteilungen mit verschieden hohen Mittelwerten.

schleimhaut und Haarwurzeln identisch ist. Dies würde zur Stützung der These führen, nach der der drumstick der Leukozytennuclei kein Geschlechtschromatin dar stellt.

Abb. 10



4.3.2. Die Voraussetzungen zur Korrelation

Eine Korrelation zwischen Beobachtungsreihen kann nur berechnet werden, wenn die Wertepaare unterschiedlich sind, damit überhaupt eine Punktwolke zustande kommen kann. Das heißt hier, daß die in der Problemstellung erwähnten und angenommenen Faktoren bei den einzelnen Organismen ihre Einflußstärke im Zeitablauf ändern, sodaß bei den einzelnen Frauen unterschiedliche Anteilswerte zu beobachten sind. Voraussetzung für eine hohe Korrelation zwischen den Anteilswerten der 50 Frauen an Chromatin-positiven Nuclei der verschiedenen Gewebe ist eine gleiche Einflußstärke der Faktoren auf diese Gewebe bei der einzelnen Testperson, sodaß sie entweder 1) hier ungefähr die gleichen Anteilswerte aufweisen oder 2) auch unterschiedliche Anteile zeigen, die Differenzen jedoch bei allen Testpersonen im Verhältnis gesehen gleich sind. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, daß die unterschiedlichen Anteilswerte bei jeder Frau ungefähr im gleichen Verhältnis zueinander stehen (vgl. 2.1., insbesondere Fußnote S. 26). Anders ausgedrückt, es kann der Fall auftreten, wo, seien jetzt nur zwei Gewebe in Betracht gezogen, bei einer Testperson der Prozentsatz an Chromatin-positiven Nuclei bei den Haarwurzeln 36 beträgt und bei den Mundschleimhautzellen 26,6, während bei einer zweiten Testperson die entsprechenden Anteilswerte 20 % und 16,2 % sind und bei einer dritten Frau 26 % und 21,4 % u.s.w. Die beiden Anteilswerte sind bei einer gleichen Testperson also unterschiedlich, ihr Verhältnis bleibt je-

doch bei allen Frauen ungefähr gleich. Daraus wird sich eine hohe Korrelation zwischen den beiden Anteilswertreihen ergeben, obwohl sie nicht identisch sind.

Die beiden obigen Alternativannahmen sollen jetzt für die Zusammenhänge für Mundschleimhaut und Haarwurzeln nachgeprüft werden, da nur zwischen diesen beiden Geweben eine ziemlich hohe Korrelation festgestellt wurde. Im obigen 1. Fall müßten die Häufigkeitsverteilungen der beiden Gewebe identisch sein. Ein Blick auf Abb.10 läßt jedoch Verteilungen erkennen, deren Ungleichheit sich durch einen Chi-Quadrat-Test als signifikant erweist.

KONTINGENZTAFEL
(2 Zeilen und 2 Spalten)

	m	o	Σ
H	6687	18313	25000
M	5283	19717	25000
Σ	11970	38030	50000

m = Anzahl der Nuclei mit X-Chromatin
o = Anzahl der Nuclei ohne Chromatin

Zur Berechnung der Prüfgröße dienen folgende Werte:

fo	fe	fo-fe	$\frac{(fo-fe)^2}{fe}$
6687	5985	702	82,3390
5283	5985	702	82,3390
18313	19015	702	25,9166
19717	19015	702	25,9166
			216,5112 Σ

Bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ und bei 1 Freiheitsgrad erhält man laut Tabelle den Kritischen Wert 3,8. Da die Prüfgröße einen weit höheren Wert als den kritischen annimmt, muß die Hypothese, daß die beiden Häufigkeitsverteilungen identisch sind, verworfen werden⁺⁾.

^{+) Die Kontingenztafeln für Haarwurzelszellen und Blut, sowie Mundschleimhaut und Blut sind:}

	m	o	Σ
H	6687	18313	25000
B	738	24262	25000
Σ	7425	42575	50000

	m	o	Σ
M	5283	19717	25000
B	738	24262	25000
Σ	6021	43979	50000

Der kritische Wert beträgt auch hier jeweils 3,8. Die ermittelten Prüfgrößen sind für die erste Kontingenztafel $\chi^2 = 5597,6638$ und für die zweite $\chi^2 = 3900,5318$. Die Prüfgrößen liegen also weit über dem kritischen Wert, die Häufigkeitsverteilungen sind auch hier auf keinen Fall identisch.

Nun gilt es, den 2. Fall nachzuweisen. Die Tatsache, daß die beiden Verteilungen verschoben sind, spricht nicht gegen die Annahme, daß die relativen Unterschiede zwischen den Anteilswerten bei allen Frauen grob gesehen gleich sind. Gestärkt wird diese Annahme dadurch, daß die beiden Regressionsgeraden, die im Korrelationsdiagramm für Mundschleimhaut und Haarwurzeln konstruiert werden könnten (vgl. S. 56 f), die Abszisse bzw. Ordinate ziemlich nahe beim Ursprung schneiden, als Zeichen einer hohen Korrelation einen recht kleinen Winkel φ entstehen lassen und Anstiege von ungleich 45° besitzen würden - wie man leicht sieht, wenn man die beiden Regressionsgeraden auch nur nach Augenmaß bestimmt. Diese vorgestellten Regressionsgeraden können, weil eben ihr Schnittwinkel φ sehr klein ist und sie die Koordinatenachsen nahe beim Ursprung schneiden, durch nur eine Gerade approximiert werden, die durch den Ursprung und den Schnittpunkt der beiden Regressionsgeraden gelegt wird. Ihre Konstruktion ist sehr einfach, da sich die Regressionsgeraden bei den Mittelwerten der Untersuchungsmerkmale schneiden^{+) (vgl. Abb. 7). Diese Gerade macht deutlich, daß sich bei allen Frauen die Anteilewerte Chromatin-positiver Mundschleimhaut- und Haarwurzelzellkerne im Durchschnitt gleich verhalten, die konstanten Quotienten $\frac{\%H}{\%M}$ bzw. $\frac{\%M}{\%H}$ weisen die ungefähren Werte 1,23 bzw. 0,79 auf. Bei jeder Frau stehen, grob gesprochen, 5 er-}

^{+) vgl. CHRISTMANN, 1970h}

kennbare Chromatin-positive Mundschleimhautnuclei gegenüber. Daß man keinen Korrelationskoeffizienten von 1 erhält, also keine Punktwolke, die eine Gerade bildet, ist auf marginale Einflüsse zurückzuführen, die das Ergebnis nicht wesentlich verändern. Die Güte der Abstriche und die persönliche Unzulänglichkeit bei der Auswertung können solche Einflüsse darstellen, wie auch Mundinfektionen und die Art der Haarpflege. Ständiges Färben und Bleichen der Haare kann ohne Weiteres auf die Haarwurzelzellen einwirken und das Erscheinungsbild für Geschlechtschromatin beeinträchtigen.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit gestellte Aufgabe ist die Ermittlung der Anteilswerte an Chromatin-positiven Nuclei bei menschlichen Haarwurzel-, Mundschleimhaut- und Blutzellen sowie die Korrelation zwischen diesen Werten. Zu diesem Zweck wurden 50 zufällig ausgewählte Frauen jeglichen Alters untersucht. Von jeder Testperson wurde pro Merkmal ein Abstrich angefertigt, um dann jeweils 500 Nuclei auszuwerten. Mit einer geeigneten statistischen Methode (χ^2 -Test, vgl. 4.1.) wurde nachgewiesen, das keine signifikanten persönlichen Auswertungsfehler vorliegen.

Die vorläufigen Untersuchungsergebnisse werden in folgender Darstellung verdeutlicht:

	Haarwurzeln	Mundschleimhaut	Blut
	%	%	%
$\bar{x}$	26,75	21,13	2,95
var.	42,26	35,05	2,36
s	6,50	5,92	1,54
v	24,30	28,01	52,09

$\bar{x}$ sind die bei den 50 Frauen durchschnittlichen Prozentsätze an Chromatin-positiven Nuclei pro 500 untersuchten Zelleneines jeden Merkmals.

var. ist die Varianz der pro Merkmal 50 ermittelten Pro-

zentsätze an Chromatin-haltigen Zellkernen (bei jeweils 500 untersuchten Zellen).

s und v sind die dazugehörige Standardabweichung bzw. Variabilitätskoeffizient.

Aus diesen Werten läßt sich mit Hilfe der standardisierten Normalverteilung folgende Aussage ableiten:

bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % liegt der Anteilswert an Chromatin-positiven Nuclei der Haarwurzel-, Mundschleimhaut und Blutzellen bei Frauen in den Intervallen $26,75 \pm 3,84$ %; $21,13 \pm 3,58$ % und $2,95 \pm 1,48$ %.

Die Häufigkeitsverteilungen der ermittelten Anteilswerte sehen sich für Haarwurzeln und Mundschleimhaut sehr ähnlich, sind aber auf der Abszisse verschoben und können mit der entsprechenden Häufigkeitsverteilung für Blut überhaupt nicht verglichen werden (vgl. Abb. 10). Die Korrelation zwischen den ermittelten Prozentsätzen an drumstick- und X-Chromatin-positiven Nuclei ist gering, während die Korrelation zwischen den Haarwurzel- und Mundschleimhautanteilswerten sehr hoch ist.

Auf Grund dieser Ergebnisse könnte man wage vermuten, daß der drumstick der Leukocyten kein X-Chromatin ist (vgl. HAMERTON, 1971). Es kann natürlich auch sein, daß diese Vermutung der Nichtidentität von drumsticks und Geschlechtschromatin nicht zutrifft, nämlich dann, wenn die technischen Faktoren (Färbung, Art und Ausführung des Blutabstriches) wegen der spezifischen Beschaffenheit der Blutzellen eine gewichtigere Rolle spielen als bei den Haarwurzel- und Mundschleimhautzellen, so daß eine mögliche grundle-

gende Identität zwischen drumsticks und Geschlechtschromatin verschleiert wird (vgl. KÖBBERLING, 1966, Abschnitt 1.5.).

Die Korrelationskoeffizienten der Beziehung Mundschleimhaut/Blut und Haarwurzeln/Blut nehmen annähernd gleiche Werte an, nämlich $r = 0,36$ und $r = 0,37$. Die dazugehörigen Diagramme (vgl. Abb. 8 und 9) sehen sich - ebenso wie die Häufigkeitsverteilungen der Anteilswerte (vgl. oben) - sehr ähnlich und scheinen auch verschoben. Der Korrelationskoeffizient für die Beziehung Haarwurzeln/Mundschleimhaut hat den Wert $r = 0,80$. Die Arbeitshypothese hat sich also nur für diesen letzten Fall bestätigt (vgl. 2.1.).

Nach der LYON-Hypothese wird die Anwesenheit eines genetisch inaktiven X-Chromosoms in jeder Zelle der Organismen weiblicher Säugetiere postuliert. Die Tatsache, daß der Prozentsatz Geschlechtschromatin-haltiger Nuclei in keinem Gewebe 100 ist, kann bedeuten, daß die X-Inaktivierung nicht immer gleichzeitig mit der Heteropyknose zusammenfällt. Diese Diskrepanz kann man durch die Annahme von - beim jetzigen Kenntnisstand noch unbekannten - Faktoren erklären, die die Heteropyknose bestimmen. Da die bei den untersuchten Geweben der 50 Frauen gewonnenen Anteilswerte X-Chromatin-positiver Nuclei stark schwanken (zwischen 10 % und 41 % bei Haarwurzeln, 6 % und 40,2 % bei Mundschleimhaut und zwischen 0,8 % und 7 % bei Blut, aber hier ist die Frage noch offen, ob es sich bei den drumsticks um Geschlechtschromatin handelt)

kann gefolgert werden, daß diese Faktoren bei den einzelnen Individuen unterschiedlich stark wirken; vielleicht, weil sie ihre Einflußstärke im Zeitablauf ändern. Man hat nämlich divergierende Häufigkeiten Chromatin-positiver Zellkerne bei gleichartigen Geweben eines Organismus während unterschiedlicher Entwicklungsstufen beobachtet (vgl. 1.2.3.).

Wie oben erwähnt, sind die bei den einzelnen Testpersonen ermittelten Prozentsätze an Chromatin-positiven Nuclei bei Haarwurzeln, Mundschleimhaut und Blut unterschiedlich⁺⁾ und diese Unterschiede können nicht dem Zufall zugeschrieben werden, was ein entsprechender χ^2 -Test gezeigt hat (vgl. 4.3.2.).

Trotzdem ist eine hohe Korrelation zwischen den ermittelten Prozentsätzen an Chromatin-positiven Nuclei bei Haarwurzeln- und Mundschleimhautzellen gefunden worden. Das ist dadurch zu erklären, daß zwischen den Unterschieden in den Anteilswerten an Chromatin-positiven Nuclei bei Haarwurzeln und Mundschleimhaut ein Zusammenhang besteht, wie er bei den entsprechenden Werten von Haarwurzeln und Blut sowie Mundschleimhaut und Blut nicht gegeben ist, nämlich der, daß die Differenzen in den Anteilswerten bei den einzelnen Frauen relativ gesehen ungefähr gleich sind. Das heißt, die Anteilswerte an Chromatin-haltigen Nuclei beider Gewebe müssen bei jeder Frau im ungefähr gleichen Verhältnis zueinanderstehen (vgl. 4.3.2.). Die-

⁺⁾ Das kann man der Abb. 10 entnehmen, in der die drei Häufigkeitsverteilungen der Anteilswerte nicht miteinander übereinstimmen.

ses Hauptergebnis der Arbeit kann man anschaulich im Korrelationsdiagramm (Abb. 7) darstellen, indem man die beiden Regressionsgeraden dieses Diagrammes durch eine Gerade approximiert, die durch den Ursprung und den Schnittpunkt der beiden Regressionsgeraden gelegt wird (vgl. 4.3.2). Der Anstieg dieser Gerade ist ungleich 45° , die Anteilswerte verhalten sich nicht wie 1 : 1, sondern es kommen für jede untersuchte Frau im Durchschnitt auf 5 erkennbare Chromatin-positive Haarwurzelkerne ungefähr 4 Chromatin-positive Mundschleimhautkerne. Das heißt, daß auch die relativen Unterschiede $\frac{\%H - \%M}{\%H}$ und $\frac{\%H - \%M}{\%M}$ bei allen Frauen ungefähr gleich sind. Die folgende Tabelle liefert eine Zusammenfassung der ermittelten Werte:

:	%H	%M	%H - %M
%M	1,23	1	0,23
%H	1	0,79	0,21

Ein letztes Ergebnis, jedoch mehr praktischer und technischer Natur, ist die Erfahrung, daß sich die Haarwurzelmethode für die Geschlechtsdiagnose als sehr geeignet erweist wegen des hohen durchschnittlichen Prozentsatzes an Chromatin-haltigen Zellkernen der Präparate und wegen ihrer einfachen und schnellen Anfertigung sowie ihrer deutlichen Färbung und der damit verbundenen eindeutigen Auswertbarkeit.

A N H A N G

TABELLE 1

Korrelation zwischen Sexchromatin und X-Chromosomen

Anzahl der Sexchromatinmassen	Sexchromosomenkomplex
0	XY, XO
1 (wenig entwickelt)	XX
1	XX, XXY, XXYY, (XO)
2	XXI, XXYY
0/2	XO, XX
3	XXXX

Quelle: Little Clubs Clinics in Developmental Medicine

Nr. 5, Chromosomes in medicine, HAMERTON, J.L.

Verlag, 1962, S. 68

TABELLE 2

Variabilität der Heterochromatinmenge bei Menschen mit normalem und aneuploidem Genotyp

Genotyp	Euchromatisches Sexchromosom	Heterochromatische Sexchromosomen
46,XX	X	X
46,XY	X	Y
47,XXY	X	XY
48,XXXY	X	XXY
49,XXXXY	X	XXXY
47,XYY	X	YY
45,X	X	O
47,XXX	X	XX
46,XXqi	X	Xqi
46,XXp-	X	Xp-
46,XXr	X	Xr
46,XXq-	X	Xq-
46,XXpi	X	Xpi
46,XYqi	X	Yqi

Quelle: HAMERTON, J.L. " Human Cytogenetics " Vol. I,
1971, Academic Press New York and London S.177

TABELLE 3

Untersuchungsergebnisse

Nr.	Haarwurzeln			Mundschleimhaut		
	Zahl der unters. Zellen	Zahl der BARR-bo- dies	% BARR-bo dies	Zahl der unters. Zellen	Zahl der BARR-bo- dies	% BARR-bo dies
1	500	205	41	500	201	40,2
2	500	180	36	500	153	30,6
3	500	181	36,2	500	184	36,8
4	500	170	32,4	500	141	28,2
5	500	150	30	500	135	27
6	500	158	31,6	500	126	25,2
7	500	135	27	500	118	23,6
8	500	135	27	500	120	24
9	500	119	23,8	500	90	18
10	500	119	23,8	500	105	21
11	500	130	26	500	100	20
12	500	157	31,4	500	132	26,4
13	500	142	28,4	500	104	20,8
14	500	153	30,6	500	115	23
15	500	141	28,5	500	108	21,6
16	500	138	27,6	500	100	20
17	500	100	20	500	81	16,2
18	500	162	32,4	500	148	29,6
19	500	139	27,8	500	122	24,4
20	500	123	24,6	500	90	18

Fortsetzung der TABELLE 3

21	500	130	26	500	107	21,4
22	500	120	24	500	112	22,4
23	500	144	28,8	500	129	25,8
24	500	109	21,8	500	111	22,2
25	500	119	23,8	500	91	18,2
26	500	104	20,8	500	82	16,4
27	500	140	28	500	111	22,2
28	500	161	32,2	500	91	18,2
29	500	101	20,2	500	87	17,4
30	500	105	21	500	77	15,4
31	500	80	16	500	75	15
32	500	147	29,4	500	119	23,8
33	500	184	36,8	500	127	25,4
34	500	100	20	500	84	16,8
35	500	151	30,2	500	118	25,6
36	500	133	26,6	500	100	20
37	500	142	28,4	500	84	16,8
38	500	70	14	500	50	10
39	500	68	13,6	500	58	11,6
40	500	84	16,8	500	104	20,8
41	500	187	37,4	500	155	31
42	500	102	20,4	500	121	24,2
43	500	173	34,6	500	110	22
44	500	127	25,4	500	94	18,8
45	500	157	31,4	500	100	20
46	500	155	31	500	116	23,2
47	500	50	10	500	30	6

Fortsetzung der TABELLE 3

48	500	130	26	500	50	11
49	500	153	30,6	500	11	20,2
50	500	124	24,8	500	34	17,2

$$\bar{x} = 133,74 = 26,75\%$$

$$\bar{x} = 105,66 = 21,13\%$$

$$\text{var.} = 1056,60 = 42,26\%$$

$$\text{var.} = 876,31 = 35,05\%$$

$$s = 32,50 = 6,50\%$$

$$s = 29,60 = 5,92\%$$

$$v = 24,30\%$$

$$v = 28,01\%$$

$\bar{x}$ = Mittelwert

var.=Varianz

s = Standardabweichung

v = Variabilitätskoeffizient

Fortsetzung der TABELLE 3

Nr.	Blut							
	Typen							
	A		B		C		O	
	N	%	N	%	N	%	N	%
1	20	4	69	13,8	47	9,4	364	72,8
2	35	7	87	17,4	31	6,2	347	69,4
3	35	7	57	11,4	9	1,8	399	79,8
4	15	3	70	14	20	5	390	78
5	19	3,8	55	11	31	6,2	395	79
6	17	3,4	65	13	30	6	388	77,6
7	14	2,8	40	8	23	4,6	423	84,6
8	16	3,2	59	11,8	39	7,8	386	77,2
9	11	2,2	30	6	17	3,4	442	88,4
10	11	2,2	48	9,6	22	4,4	419	83,8
11	25	5	65	13	36	7,2	374	74,8
12	14	2,8	32	6,4	15	3	439	87,8
13	20	4	49	9,8	25	5	406	81,2
14	14	2,8	43	8,6	28	5,6	415	83
15	14	2,8	42	8,4	27	5,4	417	83,4
16	11	2,2	39	7,8	23	4,6	427	85,4
17	6	1,2	40	8	20	4	434	86,8
18	14	2,8	37	7,4	23	4,6	426	85,2
19	8	1,6	44	8,8	25	5	423	84,6

Fortsetzung der TABELLE 3

20	24	4,8	40	8	26	5,2	41,7	88
21	22	4,4	41	8,4	35	6,6	41,3	88,6
22	16	3,2	50	10	29	5,8	40,5	77
23	12	2,4	50	6	20	4	43,5	67,6
24	10	2	34	6,8	20	4	43,5	67,7
25	9	1,8	30	6	13	3,8	44,2	69,1
26	17	3,4	60	12	36	7,6	58,6	77
27	5	1	47	9,4	30	6	41,5	68,8
28	19	3,8	48	8,4	20	5,2	41,1	69,7
29	9	1,8	30	6	10	4	41,1	69,1
30	9	1,8	30	6	13	3,8	41,1	69,1
31	11	2,2	44	8,8	20	5,6	41,7	69,1
32	10	2	40	8	10	5	41,0	71
33	10	2	40	8	20	6,8	41,0	71,0
34	7	1,4	11	4,2	10	2,2	41,7	72,7
35	9	1,8	20	5	10	3,6	41,0	72,7
36	9	1,8	50	6,2	20	5,6	41,0	72,7
37	4	0,8	17	7,2	10	4,2	41,0	72,7
38	7	1,4	40	8,2	10	4	41,0	72,7
39	8	1,6	40	8	11	5,4	41,0	72,7
40	5	1	33	6,2	10	4,8	41,0	72,7
41	16	3,2	47	9,4	30	6,2	40,6	81,8
42	23	4,6	45	8,6	26	5,2	40,8	81,8
43	18	3,6	52	10,4	29	5,8	40,1	90,2
44	11	2,2	38	7,6	31	6,2	42,0	84

Fortsetzung der TABELLE 3

45	10	2	35	7	20	4	435	87
46	9	1,8	37	7,4	21	4,2	433	86,6
47	4	0,8	39	7,8	26	5,2	431	86,2
48	10	2	40	8	29	5,8	421	84,2
49	12	3,8	40	8	26	5,2	415	83
50	32	6,4	49	9,8	26	5,2	393	78,6

$$\bar{x}=14,76=2,95\%$$

$$\text{var.}=59,12=1,36\%$$

$$s=7,69=1,54\%$$

$$v=52,09\%$$

Die Zahl der untersuchten Blutzellen ist 500 pro Testperson, N beschreibt die Anzahl der Nuclei mit einem bestimmten Merkmal (A, B, C oder O) und % bedeuten die entsprechenden Anteilswerte.

A = A-Körperchen = drumsticks

B = B-Körperchen = nodules sexiles

C = C-Körperchen

O = Leukozyten ohne A,B,C.

L I T E R A T U R

- BACK, F.; DÖRMER, P. (1967). X-chromosom activity in lymphocytes. *Lancet*, 1/7486:385
- BARR, M.L. (1939). Some observations on the morphology of the synapse in the cat's spinal cord. *J. Anat.*, 74:1
- BARR, M.L.; BERTRAM, E.G. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated synthesis. *Nature (Lond.)*, 163:676
- BEUTLER, E.; YEH, M.; FAIRBANKS, V.F. (1962). The normal human female as a mosaic of x chromosom activity: studies using the gene for G-6-Pd-deficiency as a marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. M. S.*, 48:9
- CAJAL, R.Y. (1909). *Histologie du Systeme Nerveux de le Homme et des Vetebres. Tome 1*, A. Malone Paris
- CARATZALI, A.; PHLEPS, A. (1958). Considérations sur le déterminism des corpuscles sexuels des leucocytes. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 152:1114
- CARATZALI, A. (1963). Sex appendages, Arneth formula and menstrual cycle. *Cytogenetics (Basel)*, 2:15
- CEDERQVIST, L.L.; FUCHS, F. (1971). Intrauterine diagnosis of genetic disorders. *intra uterin diagnostik av arftliga sjukdomar. Nord. med.*, 86/35:1017
- CHRISTMANN, G.; KRICKE, M.; SCHAFFRANECK, M.; WINKLER, K. *Übungen zur statistischen Methodenlehre. 4. Auflage. Mannheim*, 1970a, S. 176; 1970b, S. 218 f.; 1970c, S. 216 f.; 1970d, S. 180 f.; 1970e, S. 252 f.; 1970f, S. 254; 1970g, S. 262; 1970h, S. 263
- COMINGS, D.E. (1966). The inactive X chromosom. *Lancet*, 2:1137
- CURTIS, D.S. (1969). Sex chromatin frequency in buccal mucosal tissue: the normal female population. *Cytogenetics*, 8/1:20

- DANEMAN, D. (1970). A survey of the incidence of sex chromatin in a group of South African students. *Leech (Johannesburg)*, 40/1:9
- DANES, B.S.; BEARN, A.G. (1965). Hurler's syndrome: demonstration of an inherited disorder of connective tissue in cell culture. *Science*, 149:987
- DANES, B.S.; BEARN, A.G. (1966). Hurler's syndrome: a genetic study in cell culture. *J. Exptl. Med.*, 123:1
- DAVIDSON, W.M.; SMITH, D.R. (1954). A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Brit. Med. J.*, 2:6
- DAVIDSON, W.M. (1960). Zitiert im Leitartikel: Human chromosomal abnormalities. *Lancet*, 2:448
- DAVIDSON, W.M.; WINN, S. (1961). The relationship between the sex nodule and the sex chromosome. In "Human Chromosomal Abnormalities". Herausgegeben von Davidson und Smith, Staple Press London, S. 28
- DAVIDSON, W.M.; FLUTE, P.T. (1962). Sex dimorphism in polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Acta Cytol.*, 6:13
- DOLLMANN, A.; NOCKE, W.; STENGEL-RUTKOWSKI, S. (1972). Gonadendysgenese mit ungewöhnlicher Strukturanomalie eines X-Chromosoms (45,X/46,XXq). *Humangenetik*, 14:285
- EPSTEIN, C.J. (1972). Inactivation of the X chromosome. *New Engl. J. Med.*, 286/6:318
- FUJIMOTO, W.Y.; SEEGLER, J.E.; UHLENDORF, B.W.; JACOBSEN, C.B. (1968). Biochemical diagnosis of an X-linked disease in utero. *Lancet*, 2:511.
- GERMAN, J. (1964). The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. *J. Cell. Biol.*, 20:37
- GILBERT, C.W.; MULDAL, S.; LAJTHA, L.G.; ROWLY, J. (1962). Time sequence of human chromosome replication. *Nature (London)*, 195:869

- GOLDSTEIN, A.I.; LUKESH, R.C.; KETCHUM, M. (1973). Prenatal sexdetermination by fluorescent staining of the cervical smear for the presence of a Y chromosome: An evaluation. Amer. J. Obstet. Gynec., 115/6: 866
- GRAHAM M.A. (1954). Sex chromatin in cell nuclei of the cat from the early embryo to maturity. Anat. Rec., 119:469
- GRAHAM, M.A.; BARR, M.L. (1959). Sex chromatin in the opossum, *Didalphys virginiana*. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 48:111
- GRÜNEBERG, H. (1966a). The molars of the tabby mouse and a test of the " single active X-chromosome " hypothesis. J. Embryol. Exptl. Morphol., 15:223
- GRÜNEBERG, H. (1966b). more about the tabby mouse and about the Lyon hypothesis. J. Embryol. Exptl. Morphol., 16:569
- GRÜNEBERG, H. (1967). Sex-linked genes in man and the Lyon hypothesis. Ann. Human Genet., 30:239
- GRUMBACH, M.M.; BARR, M.L. (1958). Cytologic tests of chromosomal sex in relation to sexual anomalies in man. Recent Progr. Hormone Res., N.Y. 14:255
- GRUMBACH, M.M.; MORISHIMA, A.; CHU, E.H.Y. (1960). On the sex chromatin and the sex chromosomes in sexual anomalies in man: relation to origin of the sex chromatin. Amer. J. Dis. Child., 100:548
- HAGY, G.W.; BRODRICK, M.M. (1972). variation of sex chromatin in human oral mucosa during the menstrual cycle. Acta Cytol. (Balt.), 16/4:314
- HAMERTON, J.L.; KLINGER, H.P.; MUTTON, D.E.; LANG, E.M. (1963). The somatic chromosomes of the hominoidea. Cytogenetics, 2:240
- HAMERTON, J.L. (1968). The significance of sex chromosome derived heterochromatin in mammals. Nature, 219: 910
- HAMERTON, J.L., Human Cytogenetics, Band 1. Academic Press, New York und London, 1971 S. 166

- KALLAPRAVIT, B. (1970). Sex chromatin study in the hair root. *J. Med. Ass. Thailand - Bangkok*, 57/1:29
- KLINGER, H.P. (1957). The sex chromatin body in fetal and maternal portions in the human placenta. *Acta Anat. (Basel)*, 30:371
- KLINGER, H.P.; SCHWARZACHER, H.G. (1960). The sex chromatin and heterochromatic bodies in human diploid and polyploid nuclei. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 8:345
- KLINGER, H.P.; DAVIS, J.; GOLDHUBER, P.; DITTA, T. (1968). Factors influencing mammalian X-chromosome condensation and sex chromatin formation. 1. the effect of in vitro cell density on sex chromatin frequency. *Cytogenetics*, 7/1:39
- KÖBBERLING, J. (1966). Die Häufigkeit von drumsticks in Abhängigkeit von der Präparation der Zellen. *Human-genetik*, 3:104
- KREYSZIG, E., *Statistische Methoden und ihre Anwendungen*, 3. Auflage, Vandenhoeck & Ruprecht, Gottingen, 1968a, S. 126 f.; 1968b, S. 301
- LENZ, W., *Medizinische Genetik*, Deutscher Taschenbuch Verlag - Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1970a, S. 90; 1970b, S. 93
- LINDER, D.; GARTLER, S.M. (1965). Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilisation as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science*, 150:67
- LINDSAY, H.A.; BARR, M.L. (1955). Further observations on the behaviour of nuclear structure, during deflection and restoration of Missl material. *J. Anat. (Lond.)*, 89:47
- LINDSTEN, J. (1963). The nature and origin of X-chromosome aberrations in Turner's syndrome. *Almqvist und Wiksell*, Stockholm
- LYON, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature (Lond.)*, 190:372

- LYON, M.F. (1962a). Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am. J. Human Genet.*, 14:135
- LYON, M.F. (1962b). Attempts to test the inactive-X theory of dosage compensation in mammals. *Ann. Human Genet.*, 25:423
- LYON, M.F. (1963). Attempts to test the inactive-X theory of dosage compensation in mammals. *Genet. Res.*, 4:93
- LYON, M.F. (1966). X-chromosome inactivation in mammals. In "Advances in Teratology". Herausgegeben von Wollam, D.H., Academic Press, New York, Band 1, S. 25 ff.
- LYON, M.F. (1968). Chromosomal and subchromosomal inactivation. *Ann. Rev. Genet.*, 2:31
- MAC DIARMID, W.D.; LEE, G.R.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. (1967). X-inactivation in an unusual X-linked anemia and the Xga blood group. *Clin. Res.*, 15:132
- MACLEAN, N. (1962). The drumsticks of polymorphonuclear leucocytes in sex-chromosome abnormalities. *Lancet*, 1:1154
- MILES, C.P. (1960). Morphology and functional relation of sex chromatin in cultured amnion cells. *Exp. Cell Res.*, 20:324
- MITTWOCH, V. (1961). Nuclear sex and chromosome structure in mongolism and the Klinefelter Syndrome. In "Human Chromosomal Abnormalities". Herausgegeben von Davidson und Smith, Staple Press London, S. 97 ff.
- MOORE, K.L.; GRAHAM, M.A.; BARR, M.L. (1953). The detection of chromosomal sex in hermaphrodites from skin biopsy. *Surg. Gynec. Obstet.*, 96:641
- MOORE, K.L.; BARR, M.L. (1954). Nuclear morphology, according to sex, in human tissue. *Acta Anat. (Basel)*, 21:197
- MOORE, K.L.; BARR, M.L. (1955). The sex chromatin in benign tumours and related conditions in man. *Brit. J. Cancer*, 9:246

- MOORE, K.L. Sex chromatin. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, 1966a, S. 84; 1966b, S. 119; 1966c, S. 60; 1966d, S. 63; 1966e, S. 80
- MOORHEAD, P.S.; DEFENDI, V. (1963). Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. J. Cell Biol., 16:202
- OHNO, S.; KAPLAN, W.D.; KINOSITA, R. (1959). Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus Norvegicus*. Exp. Cell Res., 18:415
- OHNO, S.; MAKINO, S. (1961a). The single X-nature of sex chromatin in man. Lancet, 1:78
- OHNO, S.; KAPLAN, W.D.; KINOSITA, R. (1961b). X-chromosome behaviour in germ and somatic cells of *Rattus Norvegicus*. Exp. Cell Res., 22:535
- OHNO, S. (1962a). Persönliche Mitteilung, zitiert von MC KUSIK, V.A. (1962). On the X-chromosome of man. QUART. Rev. Biol., 37:69
- OHNO, S.; KLINGER, H.P.; AKTIN, N.B. (1962b). Human oogenesis. Cytogenetics, 1:42
- OHNO, S.; BEČAK, W.; BEČAK, M.L. (1964). X-autosome ratio and the behaviour pattern of individual X-chromosomes in placental mammals. Chromosoma (Berl.), 15:14
- OHNO, S. " Sex chromosomes and sex-linked genes ". Springer, Berlin, 1967
- OVERZIER, K. " Die Intersexualität ". Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1961a S. 80; 1961b S. 58
- PARK, W.W. (1957). The occurrence of sex chromatin in early human and macaque embryos. J. Anat., 91:369
- PFANZAGL, J. " Allgemeine Methodenlehre der Statistik II ". Sammlung Götschen, Band 747/747a. Walter de Gruyter & Co. Berlin, 1968 S. 180
- PFANZAGL, J. " Allgemeine Methodenlehre der Statistik I ". Sammlung Götschen, Band 5746. Walter de Gruyter, Berlin New York, 1972

- PINKERTON, P.H. (1967). X-linked hypochromic anemia. *Lancet*, 1:1106
- PLATT, L.I.; KAILIN, E.W. (1964). Sex chromatin frequency. *J. A. M. A.*, 187:182
- PRINCE, R.H.; GRAHAM, A.M.; BARR, M.L. (1955). Nuclear morphology, according to sex, in *Macacus Rhesus*. *Anat. Rec.*, 122:153
- ROSENBLOOM, F.M.; KELLY, W.N.; HENDERSON, J.F.; SEEGMILLER, J.E. (1967). Lyon hypothesis and X-linked disease. *Lancet*, 2:305
- SCHWARZACHER, H.G. (1963). Sex chromatin in living human cells in vitro. *Cytogenetics*, 2:117
- SCHWINGER, E.; RAKEBRAND, E.; MÜLLER, H.J.; BÜHLER, E.M.; TETTENBORN, U. (1971). Y-body in hair roots. *Human-genetik*, 12:79
- SIRKS, M.J.: Chromosomal structure in relation to function. in "General Genetics", Nijhoff, Den Hague, 1956, Kapitel 13, S. 297
- SOHVAL, A.R.; CASSELMAN, W.G.B. (1961). Alteration in size of nuclear sex chromatin mass (Barr body) induced by antibiotics. *Lancet*, 2:1386
- SPERLING, K. (1971). Cytogenetic studies from the hair - root. *Lancet*, 1:753
- TAYLOR, A.I. (1963). Sex chromatin in the newborn. *Lancet*, 1:912
- THERKELSEN, A.J.; PETERSEN, G.B. (1962). Frequency of sex chromatin - positive cells in the logarithmic and postlogarithmic growth phases of human cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.*, 28:588
- THERKELSEN, A.J. (1964). Lyonisation of the X-chromosome. *Lancet*, 1:987
- TSUANG, M.T.; TSUANG, H.S. (1972). A sex chromatin study of Chinese school children. *J. Med. Genet.*, 9:298

VALENTI, C.; LIN, C.C.; BAUM, A. (1972). Prenatal sex determination. Amer. J. Obstet. Gynec., 112/7:890

WOLF, U.; FLINSPACH, G.; BÖHM, R.; OHNO, S. (1965). DNS-Reduplikationsmuster bei den Riesen Geschlechtschromosomen von *Microtus agrestis*. Chromosoma (Berl.), 16:609

ZAKHAROV, A.M. (1972). Frequency of chromatin positive nuclei in buccal epithelium (Russian). Genetika (Leningrad), 8/2:192

LEBENS LAUF

Am 2. Juli 1947 wurde ich, Loredana Maria José Steiger Lepore, in Bari/Italien geboren. Meine Eltern sind Francesco Lepore und Rosa Carella.

In Bari besuchte ich die "scuola elementare", die "scuola media", das "ginnasio" und das "liceo classico - Quinto Orazio Flacco", wo ich im Juli 1965 das Abitur machte.

Danach studierte ich an der Universität von Bari Naturwissenschaften und schloß im November 1969 mit der "Laurea" ab, die vom Bayerischen Kultusministerium als Diplom in Biologie und Voraussetzung zur Promotion anerkannt wurde.

EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, daß die Dissertat-
tion von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe an-
gefertigt ist.

.

